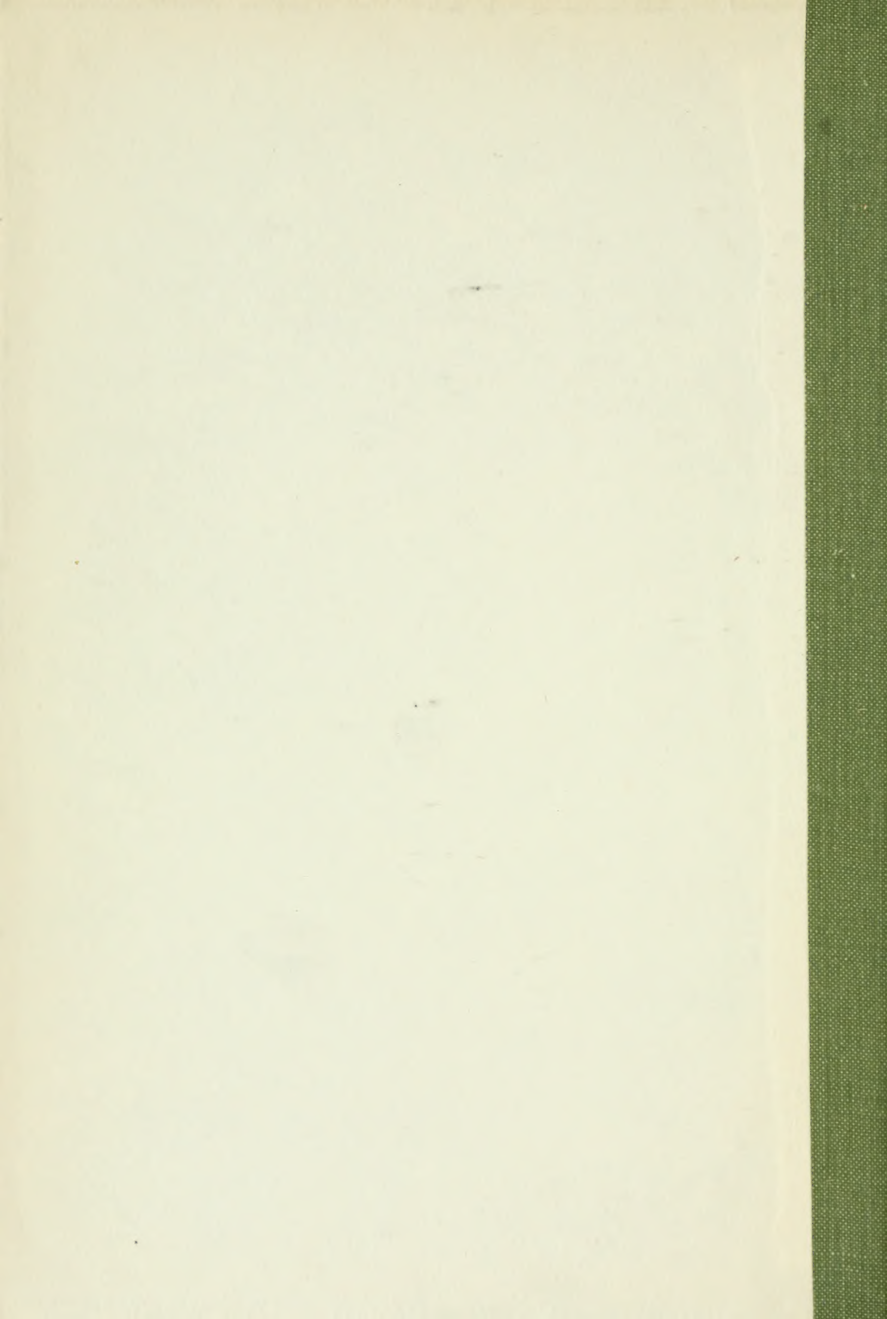
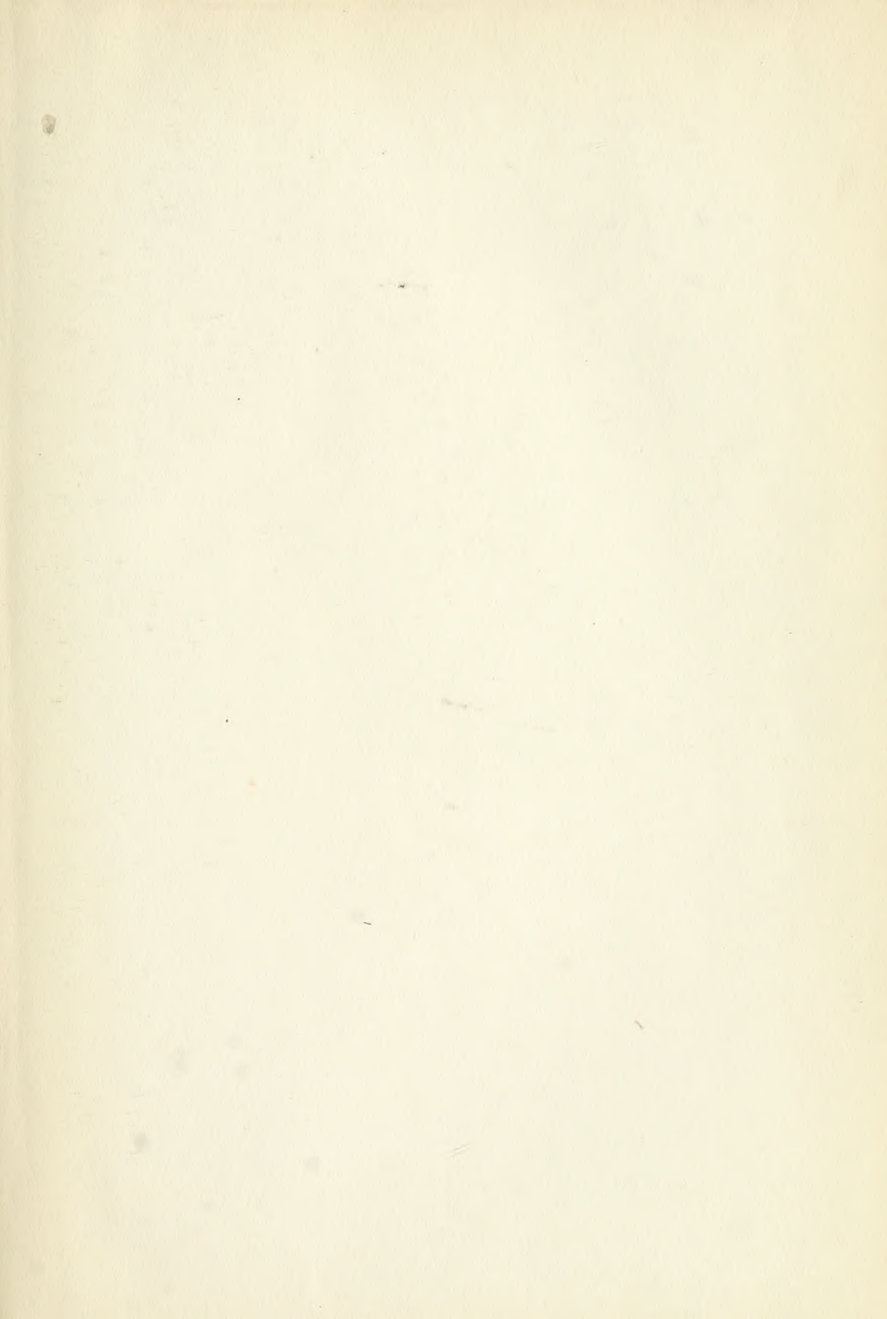
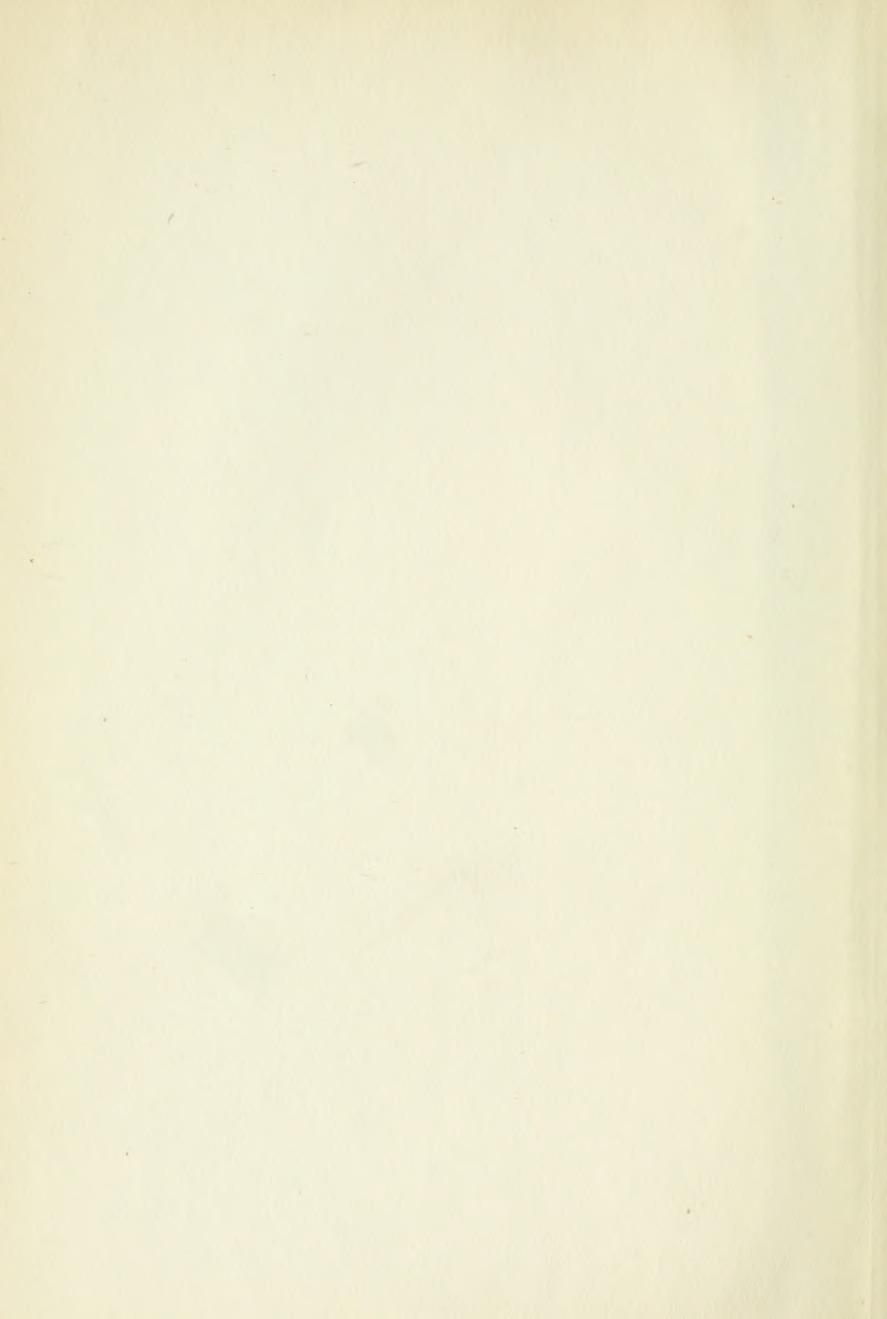
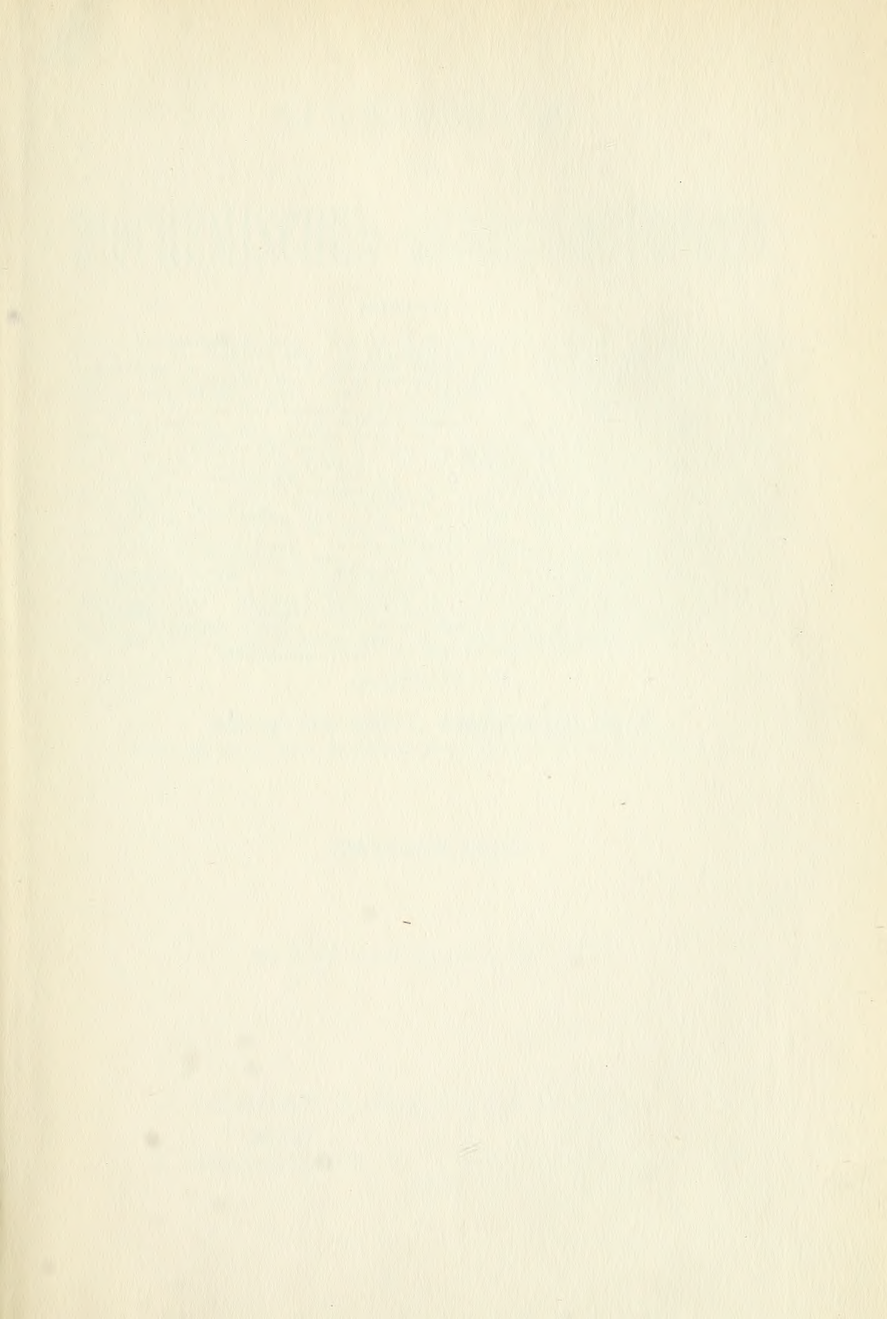
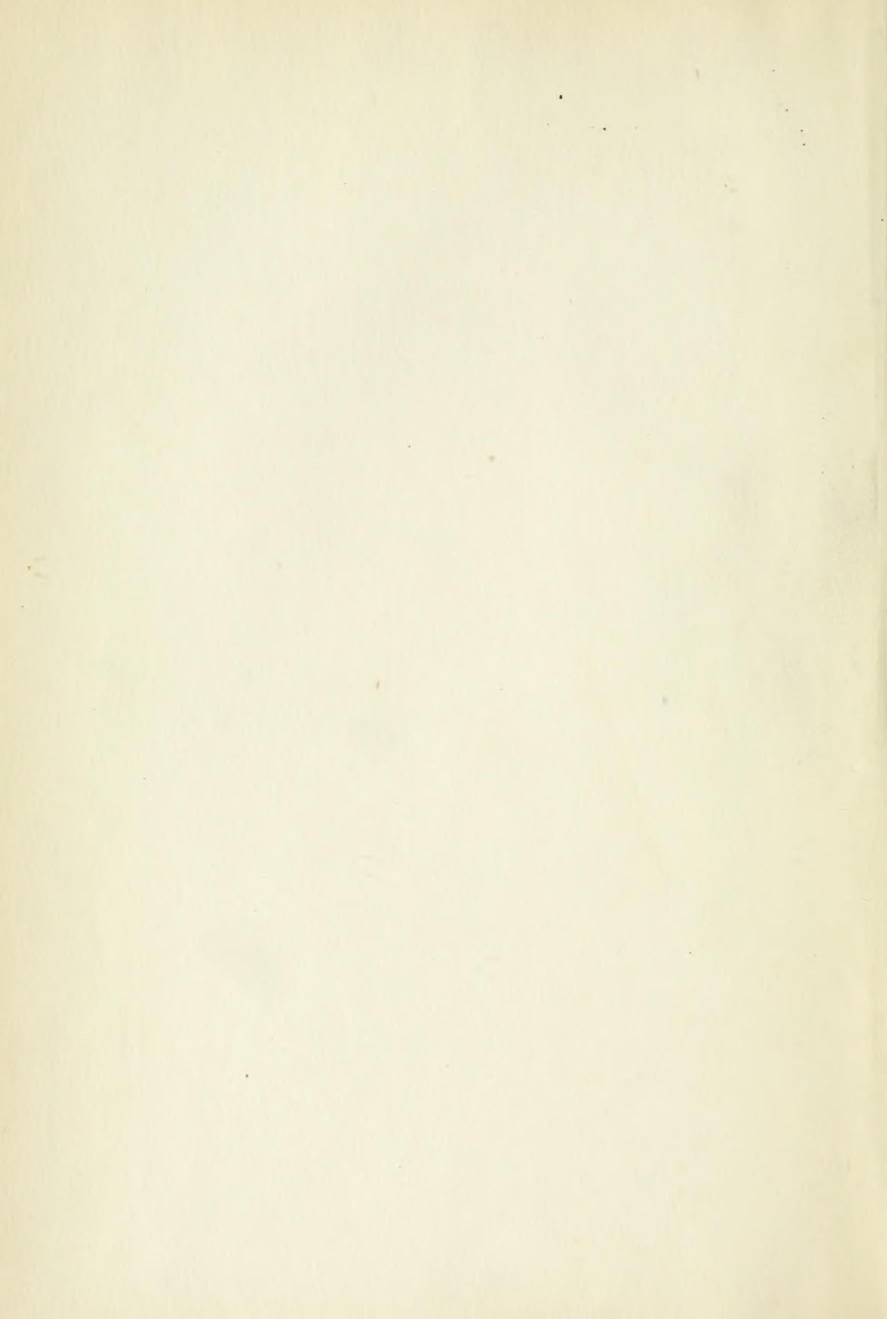












HANDBUCH

DER

BIOCHEMISCHEN ARBEITSMETHODEN.

BEARBEITET VON

Prof. Dr. **E. Abderhalden,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **D. Ackermann,** Würzburg — Prof. Dr. **Hans Aron,** Manila — Prof. Dr. **Baglioni,** Rom — Dr. phil. **Bartelt,** Berlin — Prof. Dr. **Battelli,** Genf — Prof. Dr. **J. Biehringer,** Braunschweig — Dr. phil. **Carl Brahm,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Theodor Brugsch,** Berlin — Prof. Dr. **Chodat,** Genf — Prof. Dr. **Cramer,** Edinburgh — Prof. Dr. **M. Dennstedt,** Hamburg — Prof. Dr. **Felix Ehrlich,** Breslau — Prof. Dr. med. **Embden,** Frankfurt a. M. — Prof. Dr. **St. Faust,** Würzburg — Priv.-Doz. Dr. **Friedenthal,** Nicolassee-Berlin — Prof. Dr. **E. Friedmann,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Fuhrmann,** Graz — Prof. Dr. **Wm. J. Gies,** New-York — Priv.-Doz. Dr. **Grube,** Neuenahr-Bonn — Prof. Dr. **Olof Hammarsten,** Upsala — Priv.-Doz. Dr. **Hári,** Budapest — Dr. **M. Henze,** Neapel — Priv.-Doz. Dr. **Hildebrandt,** Halle a. S. — Priv.-Doz. Dr. **Rudolf Hoeber,** Kiel — Prof. Dr. **Jacoby,** Berlin — Prof. Dr. **Johannsson,** Stockholm — Dr. phil. **R. Kempf,** Berlin — Prof. Dr. **Kobert,** Rostock — Priv.-Doz. Dr. **Kostytschew,** St. Petersburg — Prof. Dr. **William Kuester,** Stuttgart — Prof. Dr. **Kutscher,** Marburg — Prof. Dr. **Leo Langstein,** Berlin — Prof. Dr. **Loeb,** Berlin — Prof. Dr. **Jacques Loeb,** Berkeley (Kalifornien) — Prof. Dr. **London,** St. Petersburg — Prof. Dr. **Leonor Michaelis,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Franz Müller,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **M. Nierenstein,** Bristol — Prof. Dr. **Osborne,** New-Haven, Conn. — Prof. Dr. **W. Palladin,** St. Petersburg — Geh. Rat Prof. Dr. **E. Pflüger,** Bonn — Dr. phil. **Pringsheim,** Berlin — Prof. Dr. **Röhmann,** Breslau — Dr. phil. und med. **Peter Rona,** Berlin — Prof. Dr. **Rosenfeld,** Breslau — Priv.-Doz. Dr. **Franz Samuely,** Freiburg i. B. — Prof. Dr. **A. Scheunert,** Dresden — Prof. Dr. **Schittenhelm,** Erlangen — Prof. Dr. **J. Schmidt,** Stuttgart — Dr. **Schmitz,** Frankfurt a. M. — Prof. Dr. **Schulze,** Zürich — Prof. Dr. **Fr. N. Schulz,** Jena — Prof. Dr. **Siegfried,** Leipzig — Priv.-Doz. Dr. **Lina Stern,** Genf — Prof. Dr. **Steudel,** Berlin — Hofrat Prof. Dr. **J. Stoklasa,** Prag — Dr. **Eduard Strauß,** Frankfurt a. M. — Prof. Dr. **Tappeiner,** München — Geh. Rat Prof. Dr. **Tollens,** Göttingen — Priv.-Doz. Dr. **Völtz,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Weiser,** Budapest — **J. Wetzel,** Berlin — Prof. Dr. **Wiechowski,** Prag — Prof. Dr. **Willstätter,** Zürich — Prof. Dr. **E. Winterstein,** Zürich — Priv.-Doz. Dr. **Edgar Zunz,** Brüssel.

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. EMIL ABDERHALDEN,

DIREKTOR DES PHYSIOL. INSTITUTES DER TIERÄRZTL. HOCHSCHULE, BERLIN.

ZWEITER BAND.

MIT 53 TEXTABBILDUNGEN.

URBAN & SCHWARZENBERG

BERLIN — N., FRIEDRICHSTRASSE 105b

WIEN — I., MAXIMILIANSTRASSE 4

1910.

Inhaltsverzeichnis.

II. Spezieller Teil.

Nachweis und Bestimmung der biologisch wichtigen niederen Alkohole.

Von **Hans Pringsheim**, Berlin.

Eigenschaften der niederen Alkohole und der für ihren Nachweis verwandten Jodide.

Die Alkohole sind neutral reagierende, farblose Flüssigkeiten. Äthylalkohol und Propylalkohol sind mit Wasser mischbar, normaler Butylalkohol erfordert schon 12 Teile Wasser zur Lösung und Amylalkohol ist in Wasser nur noch in geringem Grade löslich. Aus ihren wässerigen Lösungen werden die Alkohole am besten mit Pottasche abgeschieden. Folgende Tabelle enthält ihre Zusammensetzung, ihre Konstitution, ihre Siedepunkte, die der zugehörigen Jodide und deren Jodgehalt.

			Siedepunkt	Siedepunkt d. Jodide	Jodgehalt der Jodide
C_2H_6O	Äthylalkohol	C_2H_5OH	76°	72°	81·4% J
C_3H_8O	Propylalkohole				
	1. Primärer	$CH_3CH_2CH_2OH$	97°	102°	74·7% J
	2. Isopropylalk. . .	$CH_3CH(OH)CH_3$	81°	89°	
$C_4H_{10}O$	Butylalkohole				
	1. Norm. prim. . .	$C_2H_5CH_2CH_2OH$	117°	130°	69·0% J
	2. Prim. Isobutylalkohol	$(CH_3)_2CH.CH_2.OH$	107°	119°	
$C_5H_{12}O$	Amylalkohole				
	1. Isobutylkarbinol	$(CH_3)_2CH.CH_2CH_2OH$	130°	148°	64·1% J
	2. Sekundärbutylkarbinol	$CH_3.CH.(C_2H_5)CH_2OH$	128°	148°	

Äthylalkohol.

Unter den niederen Alkoholen nimmt der Äthylalkohol eine Sonderstellung ein.[1]) Seine Verwendung als Genußmittel und neuerdings auch

[1]) Vgl. *E. Abderhalden*, Bibliographie der gesamten wissenschaftlichen Literatur über den Alkohol und den Alkoholismus. Berlin 1904.

sein Gebrauch als Energie- und Lichtquelle, wird ausschließlich durch die auf biologischem Wege vermittelst der Hefegärung ermöglichte leichte Beschaffung zu niederem Preise bedingt. Der Alkohol entsteht aber auch durch andere Gärungen, wie die durch Schimmelpilze, speziell die durch Mucorineen[1]) und Aspergillaceen[2]) veranlaßten. Als der am reichlichsten Alkohol bildende Schimmelpilz sei hier die Allescheria Gayonii genannt.[3]) Bakterien erzeugen ihn in schwächeren Konzentrationen[4]); sein Auftreten bei der intramolekularen Atmung[5]) bietet großes theoretisches Interesse. Es ist daher nur natürlich, daß sein Nachweis und seine Bestimmungsmethoden besser als die der anderen Alkohole ausgebildet sind.

Nachweis des Äthylalkohols. Als Vorprobe kann hier die Jodoformreaktion benutzt werden, die es noch gestattet, einen Alkoholgehalt von 1:2000 nachzuweisen. Da aber auch andere organische Verbindungen, wie z. B. Aldehyd, Aceton, Isopropylalkohol etc., dieselbe Reaktion geben, so kann man sich nur beim Ausbleiben der Reaktion mit Sicherheit auf das Nichtvorhandensein von Äthylalkohol verlassen. Methylalkohol, Essigsäure und normaler Propylalkohol liefern die Reaktion dagegen nicht.

Die Jodoformreaktion beruht auf der Bildung des leicht erkennbaren Jodoforms CHJ_3 bei der Einwirkung von Jod in alkalischer Lösung auf Alkohol. Man fügt Jod zu verdünnter Kalilauge bis zur Gelbfärbung und bringt diese durch weiteren Zusatz von Kalilauge gerade zum Verschwinden. Gibt man die so vorbereitete Lösung zu der zu prüfenden Flüssigkeit, so bildet sich bei Anwesenheit größerer Mengen von Alkohol bei gelindem Erwärmen gleich ein hellgelber Niederschlag des durch seinen charakteristischen Geruch ausgezeichneten Jodoforms; bei größerer Verdünnung muß man bis zum nächsten Tage stehen lassen, um die aus mikroskopisch sechsseitigen Tafeln oder sechsstrahligen Sternen bestehende Fällung zu erhalten.

Verwandlung des Alkohols in p-Nitrobenzoesäureäthylester.[6]) Weit zuverlässiger als die Jodoformreaktion ist die Überführung des Alkohols in p-Nitrobenzoesäureäthylester, $NO_2-C_6H_4 . CO . O . C_2H_5$, der am besten eine Anhäufung des Alkohols durch Destillation und Abscheidung aus dem Destillat mit entwässerter Pottasche vorausgeht.

[1]) Vgl. *C. Wehmer* in *Lafar,* Handbuch der technischen Mykologie. Bd. 4. S. 506. Jena 1905/07. *H. Pringsheim,* Über die Fuselölbildung durch verschiedene Pilze. Biochem. Zeitschr. Bd. 8. S. 128 (1908).

[2]) Vgl. *C. Wehmer,* l. c. Bd. 4. S. 253 (1905/07).

[3]) *Laborde,* Recherches physiologiques sur une moissure nouvelle l'Eurotiopsis Gayonii. Annales de l'Inst. Pasteur. T. 11. p. 1 (1897). — *H. Pringsheim,* Der Einfluß der chemischen Konstitution der Stickstoffnahrung auf die Gärfähigkeit und die Wachstumsenergie verschiedener Pilze. Biochem. Zeitschr. Bd. 8. S. 119 (1908).

[4]) Vgl. *A. Bau* in *Lafar,* l. c. Bd. 4. S. 399 (1905/07).

[5]) Vgl. *W. Pfeffer,* Pflanzenphysiologie. Bd. 1. S. 543. Leipzig 1897. — *Czapek,* Biochemie der Pflanzen. Bd. 1. S. 329. Jena 1905.

[6]) *E. Buchner* und *J. Meisenheimer,* Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. 38. S. 624 (1905).

Man destilliert aus der zu untersuchenden Flüssigkeit etwa den dritten Teil ab (Dest. I) und wiederholt das bei verdünnten Lösungen mit dem Destillat (Dest. II). Am sichersten gestaltet sich der Nachweis, wenn es jetzt gelingt, den Alkohol im Destillat mit Kaliumkarbonat abzuscheiden und das resultierende Öl, in später zu beschreibender Weise, durch Fraktionierung zu zerlegen. Nachdem man die Fraktion von 65—85° gesondert aufgefangen hat, verwendet man sie, oder falls die Abscheidung durch die Anwesenheit zu geringer Alkoholmengen mißlang, das Destillat II zur Umwandlung in den Nitrobenzoesäureäthylester. Hierzu wird mit käuflichem p-Nitrobenzoylchlorid erwärmt und abgekühlt. Es scheiden sich bei Anwesenheit von Alkohol Kristalle ab, die nach zweimaligem Umkristallisieren, erst aus Gasolin, dann aus Methylalkohol den Schmelzpunkt des reinen p-Nitrobenzoesäureäthylesters von 57° ergeben. Eine Stickstoffbestimmung des kristallisierten Produktes, dessen theoretischer Stickstoffgehalt 7·18% beträgt, sichert vor jedem Irrtum.

Bestimmung des Äthylalkohols.

Für die quantitative Bestimmung des Alkohols kommt hauptsächlich die Ermittlung des spezifischen Gewichtes seiner wässerigen Lösung in Betracht, mit Hilfe dessen man den Prozentgehalt an Alkohol dieser Lösung aus einer empirisch ermittelten Tabelle ablesen kann.[1]) Siehe S. 5.

Zur Bestimmung destilliert man aus der zu untersuchenden Flüssigkeit $^3/_5$ des Volumens mit Wasserdampf über, da man nur dann sicher ist, daß aller Alkohol übergegangen ist. Bei sehr verdünnten Lösungen tut man gut daran, mit dem Destillat eine neue Destillation bis zu $^3/_5$ des Volumens vorzunehmen. Der Gehalt der gleichfalls flüchtigen höheren Alkohole, die sich als Fuselöl bei der alkoholischen Gärung immer bilden[2]), hat keinen meßbaren Einfluß auf die Bestimmung des Alkohols. Dagegen muß man sich gegen das Übergehen der flüchtigen Säuren ins Destillat, welche dessen spezifisches Gewicht verändern würden, durch Neutralisation der zu destillierenden Flüssigkeit am einfachsten durch Zusatz geringer Mengen von kohlensaurem Kalk schützen.

Das spezifische Gewicht wird in einem durch die Fig. 1 veranschaulichten Pyknometer bestimmt, das man am besten auf folgende Weise eicht. Das etwa 50 *cm*³ Wasser von 15° C fassende Kölbchen wird mit 50 *g* Wasser, die genau abzuwägen sind, beschickt, und die Eichung durch eine mit Hilfe einer Feile anzubringende Marke, die scharf den

---

[1]) Auf die von *R. Gaunt*, „Zur Bestimmung des Alkoholgehaltes wässeriger Lösungen durch den Gefrierpunkt". Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 44, S. 106 (1905) ausgearbeitete kryoskopische Methode sei hier nur hingewiesen. In der Hand geübter Experimentatoren wird sie sich für Laboratorien, die im Besitze des *Beckmann*schen Apparates sind, für wissenschaftliche Zwecke wegen ihrer Zuverlässigkeit und Schnelligkeit der Handhabung gut eignen.

[2]) *H. Pringsheim*, Die Stickstoffernährung der Hefe. Teil III. Biochem. Zeitschr. Bd. 3. S. 285 (1907).

Stand des Meniskus fixiert, vorgenommen. Die Gewichtsbestimmungen sind auf der chemischen Wage mit sicherer Festlegung der dritten und möglichst genauen Ermittlung der vierten Dezimalstelle vorzunehmen.



Fig. 1.

Pyknometer zur Alkoholbestimmung.

Das spezifische Gewicht der Flüssigkeit wird nun so bestimmt, daß man das Pyknometer über die Marke hinaus mit der zu untersuchenden Flüssigkeit füllt und das gefüllte Kölbchen dann in Wasser von scharf 15° C einstellt, in dem es länger als eine halbe Stunde zu belassen ist. Während das Pyknometer noch im Wasser verharrt, saugt man mit einer engen Pipette die über der Marke stehende Flüssigkeit ab und trocknet innen mit Hilfe von Filtrierpapier. Das nach dem Entfernen aus dem Wasser auch außen gut getrocknete Pyknometer wird nun abgewogen. Das genaue Innehalten der Temperatur allein verbürgt ein zuverlässiges Resultat der Bestimmung. Das spezifische Gewicht berechnet sich wie folgt:

Bedeutet a) das Gewicht des leeren Pyknometers,
b) das Gewicht des bis zur Marke mit Wasser gefüllten,
c) das Gewicht des mit Alkohol gefüllten,

so ist das spezifische Gewicht s des Alkohols bei 15° C, bezogen auf Wasser von derselben Temperatur,

$$s = \frac{c - a}{b - a}.$$

Der Nenner dieses Bruches, das Gewicht des Wasserinhaltes des Pyknometers, ist bei allen Bestimmungen mit demselben Pyknometer gleich. Wenn das Pyknometer indes längere Zeit in Gebrauch gewesen ist, müssen die Gewichte des leeren und des mit Wasser gefüllten Pyknometers von neuem bestimmt werden, da sie sich mit der Zeit nicht unerheblich ändern können.

Aus der hier folgenden Tabelle kann jetzt der Gewichts- oder Volumenprozentgehalt des Destillates abgelesen werden, mit Hilfe dessen man durch Inbeziehungsetzung zum Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit deren Alkoholgehalt erfährt.

Tabelle zur Ermittlung des Alkoholgehaltes wässeriger Flüssigkeiten.

K. Windisch' Tafel zur Ermittlung des Alkoholgehaltes.

Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol	Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol	Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol
1·0000	0·00	0·00	0·9950	2·73	3·42	0·9900	5·76	7·18
0·9999	0·05	0·07	0·9949	2·79	3·49	0·9899	5·83	7·26
8	0·11	0·13	8	2·84	3·56	8	5·89	7·34
7	0·16	0·20	7	2·90	3·64	7	5·96	7·42
6	0·21	0·27	6	2·96	3·71	6	6·02	7·50
5	0·26	0·33	5	3·02	3·78	5	6·09	7·58
4	0·32	0·40	4	3·08	3·85	4	6·15	7·66
3	0·37	0·47	3	3·14	3·93	3	6·22	7·74
2	0·42	0·53	2	3·19	4·00	2	6·28	7·82
1	0·48	0·60	1	3·25	4·07	1	6·35	7·90
0	0·53	0·67	0	3·21	4·14	0	6·41	7·99
0·9989	0·58	0·73	0·9939	3·37	4·22	0·9889	6·48	8·07
8	0·64	0·80	8	3·43	4·29	8	6·55	8·15
7	0·69	0·87	7	3·49	4·36	7	6·61	8·23
6	0·74	0·93	6	3·55	4·43	5	6·68	8·31
5	0·80	1·00	5	3·60	4·51	6	6·75	8·40
4	0·85	1·07	4	3·66	4·58	4	6·81	8·48
3	0·90	1·14	3	3·72	4·65	3	6·88	8·56
2	0·96	1·20	2	3·78	4·73	2	6·95	8·64
1	1·01	1·27	1	3·84	4·80	1	7·02	8·73
0	1·06	1·34	0	3·90	4·88	0	7·08	8·81
0·9979	1·12	1·41	0·9929	3·96	4·95	0·9879	7·15	8·89
8	1·17	1·48	8	4·02	5·03	8	7·22	8·98
7	1·23	1·54	7	4·08	5·10	7	7·29	9·06
6	1·28	1·61	6	4·14	5·18	6	7·36	9·15
5	1·34	1·68	5	4·20	5·25	5	7·42	9·23
4	1·39	1·75	4	4·26	5·33	4	7·49	9·32
3	1·45	1·82	3	4·32	5·40	3	7·56	9·40
2	1·50	1·88	2	4·39	5·48	2	7·63	9·48
1	1·56	1·95	1	4·45	5·55	1	7·70	9·57
0	1·61	2·02	0	4·51	5·63	0	7·77	9·66
0·9969	1·67	2·09	0·9919	4·57	5·70	0·9869	7·84	9·74
8	1·72	2·16	8	4·63	5·78	8	7·91	9·83
7	1·78	2·23	7	4·69	5·86	7	7·98	9·91
6	1·83	2·30	6	4·75	5·93	6	8·05	10·00
5	1·89	2·37	5	4·81	6·01	5	8·12	10·09
4	1·94	2·44	4	4·88	6·09	4	8·19	10·17
3	2·00	2·51	3	4·94	6·16	3	8·26	10·26
2	2·05	2·58	2	5·00	6·24	2	8·33	10·35
1	2·11	2·65	1	5·06	6·32	1	8·41	10·43
0	2·17	2·72	0	5·13	6·40	0	8·48	10·52
0·9959	2·22	2·79	0·9909	5·19	6·47	0·9859	8·55	10·61
8	2·28	2·86	8	5·25	6·55	8	8·62	10·70
7	2·34	2·93	7	2·32	6·63	7	8·69	10·79
6	2·39	3·00	6	5·38	6·71	6	8·76	10·88
5	2·45	3·07	5	5·44	6·79	5	8·84	10·96
4	2·50	3·14	4	5·51	6·86	4	8·91	11·05
3	2·56	3·21	3	5·57	6·94	3	8·98	11·14
2	2·62	3·28	2	5·63	7·02	2	9·06	11·23
1	2·68	3·35	1	5·70	7·10	1	9·13	11·32

Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol	Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol	Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol
0·9850	9·20	11·41	0·9796	13·41	16·54	0·9742	17·90	21·96
0·9849	9·28	11·50	5	13·49	16·64	1	17·98	22·06
8	9·35	11·59	4	13·57	16·74	0	18·07	22·16
7	9·42	11·68	3	13·66	16·84	0·9739	18·15	22·26
6	9·50	11·77	2	13·74	16·94	8	18·23	22·35
5	9·57	11·86	1	13·82	17·04	7	18·32	22·45
4	9·65	11·95	0	13·90	17·14	6	18·40	22·55
3	9·72	12·05	0·9789	13·98	17·24	5	18·48	22·65
2	9·80	12·14	8	14·07	17·34	4	18·56	22·75
1	9·87	12·23	7	14·15	17·44	3	18·65	22·85
0	9·94	12·32	6	14·23	17·54	2	18·73	22·95
0·9839	10·02	12·41	5	14·32	17·64	1	18·81	23·05
8	10·10	12·50	4	14·40	17·74	0	18·89	23·14
7	10·17	12·59	3	14·48	17·84	0·9729	18·98	23·24
6	10·25	12·69	2	14·56	17·94	8	19·06	23·34
5	10·32	12·78	1	14·65	18·04	7	19·14	23·44
4	10·40	12·88	0	14·73	18·14	6	19·22	23·54
3	10·48	12·97	0·9779	14·81	18·24	5	19·30	23·63
2	10·55	13·06	8	14·90	18·34	4	19·39	23·73
1	10·63	13·16	7	14·98	18·44	3	19·47	23·83
0	10·71	13·25	6	15·06	18·54	2	19·55	23·93
0·9829	10·78	13·34	5	15·15	18·64	1	19·63	24·02
8	10·86	13·44	4	15·23	18·74	0	19·71	24·12
7	10·94	13·53	3	15·31	18·84	0·9719	19·79	24·22
6	11·01	13·63	2	15·40	18·94	8	19·87	24·32
5	11·09	13·72	1	15·48	19·04	7	19·95	24·41
4	11·17	13·82	0	15·56	19·14	6	20·04	24·51
3	11·25	13·91	0·9769	15·65	19·24	5	20·12	24·60
2	11·33	14·01	8	15·73	19·34	4	20·20	24·70
1	11·40	14·10	7	15·81	19·44	3	20·28	24·80
0	11·48	14·20	6	15·90	19·55	2	20·36	24·89
0·9819	11·56	14·29	5	15·98	19·65	1	20·44	24·99
8	11·64	14·39	4	16·06	19·75	0	20·52	25·08
7	11·72	14·48	3	16·15	19·85	0·9709	20·60	25·18
6	11·80	14·58	2	16·23	19·95	8	20·68	25·27
5	11·88	14·68	1	16·32	20·05	7	20·76	25·37
4	11·96	14·77	0	16·40	20·15	6	20·84	25·47
3	12·04	14·87	0·9759	16·48	20·25	5	20·92	25·56
2	12·12	14·97	8	16·57	20·35	4	21·00	25·66
1	12·20	15·07	7	16·65	20·45	3	21·08	25·75
0	12·28	15·16	6	16·73	20·55	2	21·16	25·84
0·9809	12·36	15·26	5	16·82	20·65	1	21·24	25·94
8	12·44	15·36	4	16·90	20·75	0	21·32	26·03
7	12·52	15·46	3	16·98	20·86	0·9699	21·40	26·13
6	12·60	15·55	2	17·07	20·96	8	21·47	26·22
5	12·68	15·65	1	17·15	21·06	7	21·55	26·31
4	12·76	15·75	0	17·23	21·16	6	21·63	26·41
3	12·84	15·85	0·9749	17·32	21·26	5	21·71	26·50
2	12·92	15·95	8	17·40	21·36	4	21·79	26·59
1	13·00	16·04	7	17·49	21·46	3	21·87	26·69
0	13·08	16·14	6	17·57	21·56	2	21·94	26·78
0·9799	13·16	16·24	5	17·65	21·66	1	22·02	26·87
8	13·25	16·34	4	17·73	21·76	0	22·10	26·96
7	13·33	16·44	3	17·82	21·86	0·9689	22·18	27·05

Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol	Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol	Spezifisches Gewicht des Destillats	Gewichtsprozente Alkohol	Maßprozente Alkohol
0·9688	22·25	27·14	0·9665	24·00	29·20	0·9642	25·66	31·16
7	22·33	27·24	4	24·07	29·29	1	25·74	31·24
6	22·41	27·33	3	24·15	29·38	0	25·81	31·32
5	22·49	27·42	2	24·22	29·46	0·9639	25·88	31·41
4	22·56	27·51	1	24·29	29·55	8	25·95	31·49
3	22·64	27·60	0	24·37	29·64	7	26·02	31·57
2	22·72	27·69	0·9659	24·44	29·72	6	26·09	31·65
1	22·79	27·78	8	24·51	29·81	5	26·16	31·73
0	22·87	27·87	7	24·59	29·89	4	26·23	31·81
0·9679	22·95	27·96	6	24·66	29·98	3	26·30	31·89
8	23·02	28·05	5	24·73	30·06	2	26·37	31·98
7	23·10	28·14	4	24·80	30·15	1	26·44	32·06
6	23·17	28·23	3	24·88	30·23	0	26·51	32·14
5	23·25	28·32	2	24·95	30·32	0·9629	26·57	32·22
4	23·32	28·41	1	25·02	30·40	8	26·64	32·30
3	23·40	28·50	0	25·09	30·49	7	26·71	32·38
2	23·47	28·59	0·9649	25·17	30·57	6	26·78	32·45
1	23.55	28·67	8	25·24	30·66	5	26·85	32·54
0	23·63	28·76	7	25·31	30·74	4	26·92	32·62
0·9669	23·70	28·85	6	25·38	30·82	3	26·99	32·70
8	23·77	28·94	5	25·45	30·91	2	27·05	32·78
7	23·85	29·03	4	25·52	30·99	1	27·12	32·85
6	23·92	29·11	3	25·59	31·07	0	27·19	32·93

Bestimmung des Äthylalkohols in sehr verdünnten Lösungen.[1])

Das Prinzip der Methode ist folgendes:

Fügt man nach und nach und in sehr geringen Mengen Kaliumbichromat in der Wärme zu einer sehr verdünnten Alkohollösung, und zwar in Gegenwart von Schwefelsäure, so wird die Reduktion des Bichromates in einem bestimmten Moment von einem Farbenumschlage begleitet; im Moment, wo der Alkohol ganz oxydiert ist, wird kein Bichromat mehr verbraucht, und ein geringer Überschuß an Bichromat verleiht, dank der Intensität seiner Farbe, der blaugrünen Färbung des Chromisulfats eine gelbliche Tönung, wobei ein wahrhafter Farbenumschlag zustande kommt, der das Ende der Reaktion anzeigt und den man so zur Bestimmung des Alkohols verwenden kann.

Man verfährt wie folgt:

In ein Reagenzrohr bringt man 5 cm^3 der zu untersuchenden alkoholischen Lösung, die im Maximum 1 : 500 stark sein darf; dazu fügt man 0·1 oder 0·2 cm^3 Kaliumbichromat (19 *g* pro Liter), welche Menge für gewöhnlich zu gering ist, um allen Alkohol zu oxydieren, und darauf reine

[1]) *Maurice Nicloux*, Dosage de l'alcool dans le chloroform. Bull. de la Soc. Chimique de Paris. (3. Serie.) T. **35**. S. 330 (1906).

Schwefelsäure von 66° Baumé; die Lösung erwärmt sich sehr stark und wenn genügend Säure zugesetzt ist (4·5—6 cm^3), tritt der Farbenumschlag ein und das Bichromat entfärbt sich; aus der Bürette läßt man Bichromat nachfließen, wobei man umschüttelt und zu schwachem Kochen erhitzt, bis die Färbung von Grünblau in Gelbgrün umschlägt. Man notiert dann die Menge verbrauchter Kubikzentimeter Bichromat.

Enthält die Lösung mehr als 2‰ Alkohol, was man leicht daran bemerkt, daß man mehr als 2 cm^3 Bichromatlösung zur Erreichung der gelbgrünen Färbung verbraucht, so verdünnt man auf weniger als 2‰, für welche Verdünnung der Farbenumschlag am genauesten zu beobachten ist.

Die zur Titration verwandte Menge Bichromat zeigt schon fast genau den Alkoholgehalt an, weshalb 5 cm^3 zur Bestimmung genügen. Um eine absolute Sicherheit zu erlangen, ist es empfehlenswert, die vorher gefundene Zahl zu bestätigen. Zu diesem Zwecke fügt man zu 5 cm^3 der zu untersuchenden Lösung die gefundene Anzahl Kubikzentimeter Bichromat, vermindert um 0·1 cm^3; man setzt die Schwefelsäure zu und kocht einen Moment lang auf. Die Lösung müßte noch blaugrün gefärbt sein. Man wiederholt dieselbe Operation und nimmt nun 0·1 cm^3 Bichromat mehr als die zuerst gefundene Menge. Die Färbung muß nun gelbgrün ausfallen. In diesem Falle ist die Bestimmung beendet und die zuerst gefundene Zahl ist exakt. Ist die zweite Färbung auch noch blaugrün, so fügt man 0·1 cm^3 Bichromat hinzu, worauf wieder Umschlag eintritt. Dann bedient man sich zur Berechnung der höheren Zahl: Ist n die Zahl der gefundenen Kubikzentimeter Bichromat, so ist der Alkohol in Kubikzentimeter pro Kubikzentimeter der untersuchten Lösung $= \frac{n}{1000}$.

Bei größerer Verdünnung als 1‰ Alkohol wendet man besser eine Bichromatlösung von der halben Verdünnung (9·5 g pro Liter) an.

Besonders für solche, die die Bestimmung zum ersten Male ausführen, ist die Verwendung von sechs Paar Vergleichsröhrchen empfehlenswert. Man wendet z. B. Alkohollösungen von 2, 1·5, 1, 0·8, 0·5, 0·2‰ an, die 2, 1·5, 1, 0·8, 0·5 und 0·2 cm^3 der Bichromatlösung (19 g pro Liter) bis zu gelbgrüner Färbung verbrauchen. Bei größerer Verdünnung als 1‰ nimmt man die halbkonzentrierte Bichromatlösung, von der man die doppelte Menge Kubikzentimeter verbraucht. Um in der zweiten Reihe von Röhrchen die grünblaue Färbung noch bestehen zu lassen, muß man jedesmal 0·1 cm^3 Bichromatlösung weniger zusetzen. Bei der Bestimmung des Alkohols verwendet man dann die so vorbereiteten Röhrchenpaare als Vergleichsproben. Man vergleicht die Färbung der zu untersuchenden Flüssigkeit nach dem Umschlag in gelbgrün mit der am nächsten liegenden Farbentönung der vorbereiteten Röhrchen.

Der Alkoholprozentgehalt entspricht immer der Menge der verbrauchten Kubikzentimeter Bichromat und die ganze Operation dauert nur einige Minuten.

Fehlergrenze. Die Fehlergrenze der Methode ist also 5%, in geübten Händen wird sie geringer. Der absolute Fehler liegt bei $^1/_{10000}$ cm^3 Alkohol

bei Lösungen von 1—2‰ und bei $^{1}/_{20000}\ cm^{3}$ bei schwächeren Lösungen. Nach eigenen Erfahrungen kann die Methode empfohlen werden. Der Farbenumschlag ist ohne Schwierigkeit zu erkennen.

Propyl-, Butyl- und Amylalkohole.

Der normale Propyl-, Isobutyl- und Amylalkohol finden sich in wechselndem Verhältnis, aber in allen Fällen in dem bei der alkoholischen Gärung als Nebenprodukt entstehenden Fuselöl.[1]) Der Amylalkohol ist darin als Isobutylcarbinol und sekundäres (aktives) Butylkarbinol enthalten, dessen Nachweis und Bestimmung in der Amylalkoholfraktion auf Grund seines optischen Drehungsvermögens gelingt.[2]) Die Bildung von Amylalkohol durch Bakterien ist noch nicht erwiesen; dagegen werden normaler Butylalkohol[3]) und Isopropylalkohol[4]) von ihnen in reichlicher Menge erzeugt. Höher molekulare Alkohole sind in einigen Fällen im Fuselöl aufgefunden worden; da sie jedoch nicht genau genug zu charakterisieren sind und sich nur selten vorfinden, übergehen wir ihren Nachweis.

Nachweis und Bestimmung der Propyl-, Butyl- und Amylalkohole.

Da wir keine Methoden kennen, um die genannten Alkohole in Gemischen durch spezielle Methoden nachzuweisen, muß ihrem Nachweis und ihrer Bestimmung, die dann in eins zusammenfallen, immer eine Isolierung vorausgehen. Anders verhält es sich mit der Bestimmung der als Fuselöl bezeichneten Gesamtmenge höherer Alkohole, die sich im Gärungsalkohol vorfinden. Hier behandeln wir zuerst den Fall, daß die höheren Alkohole nicht in Gegenwart größerer Mengen von Äthylalkohol entstanden sind.

Methode der Isolierung.

1. Das Trocknen der Alkohole.

Um die Alkohole zu isolieren, destilliert man aus der zu untersuchenden Flüssigkeit etwa den fünften Teil ab. Das Destillat sättigt man mit wasserfreier Pottasche und trennt die Alkoholschicht im Scheidetrichter. Um sicher zu gehen, daß kein Propylalkohol in der Salzlösung zurückbleibt, kann man aus dieser nochmals einen geringen Teil abdestillieren und wie vorher verfahren.

Der Trennung des Alkoholgemisches in seine Bestandteile — und das Vorhandensein eines solchen muß man immer erwarten — hat eine scharfe Trocknung vorauszugehen, von derem Gelingen die zur Trennung anzu-

[1]) Unter der ausgedehnten Literatur sei hier die ausführliche Arbeit von *K. Windisch*, Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt. Bd. 8. S. 140 (1893) erwähnt.

[2]) Vgl. *W. Markwald*, Über die Trennung der Amylalkohole des Fuselöls. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 1595 (1902).

[3]) Zusammenstellung bei *H. Pringsheim*, Über den Ursprung des Fuselöls und eine Alkohole bildende Bakterienform. Centralbl. f. Bakteriol. II. Abt. Bd. **15**. S. 307 (1905).

[4]) *H. Pringsheim*, ibid. S. 317, betreffend die Verbreitung des Isopropylalkohol bildenden Clostridium Americanum. Ibid. Bd. **16**. S. 795 (1906) und Bd. **20**. S. 248 (1908).

wendende fraktionierte Destillation in hohem Maße abhängig ist. Um die Hauptmenge des Wassers zu entfernen, läßt man das Alkoholgemisch zuerst über gebranntem Kalk stehen; dann kocht man es während einiger Stunden über gebranntem Kalk am Rückflußkühler und entfernt die letzten Spuren von Wasser schließlich durch Sieden über Baryumoxyd. Da Baryumoxyd nur in wasserfreien Alkoholen mit gelblicher Farbe löslich ist, zeigt am Ende der Trocknung das Auftreten dieser Färbung die Trockenheit der Alkohole an.

2. Die fraktionierte Destillation.

Zur fraktionierten Destillation bedient man sich eines dreikugeligen Fraktionieraufsatzes, den man am besten mit drei Platindrahtnetzen versieht, die im unteren Teile der Kugeln zu liegen kommen. Wenn möglich verwendet man ein abgekürztes Thermometer, dessen Skala innerhalb der in Betracht kommenden Temperaturgrade ganz vom Dampf umspült wird. Man sammelt nun im Anschluß an die vorher gegebene Tabelle verschiedene Fraktionen, die man einer erneuten Fraktionierung unterwerfen muß. Bei geringen Alkoholmengen tut man gut daran, die bei den höheren Graden siedenden Anteile der niederen Fraktion mit den niedrig siedenden Anteilen der höheren Fraktion zu vereinigen. Die Zahl der Fraktionierungen hängt von der Zahl der vorhandenen Alkohole ab; über sie kann deshalb nur im einzelnen Falle für sich entschieden werden, wofür das Kriterium natürlich die Konstanz der Siedepunkte der einzelnen Fraktionen sein muß.

So kommt man zu einer annähernden quantitativen Trennung des Gemisches in die einzelnen Bestandteile, die bei Anwesenheit von nur zwei Alkoholen auf ziemliche Genauigkeit, etwa innerhalb von 10% der Theorie, Anspruch erheben darf. Doch gelingt die Trennung auch bei mehr Alkoholen, ja beim Vorhandensein aller fünf ließen sich die einzelnen Bestandteile noch mit Schärfe nachweisen und mit einiger Sicherheit trennen.[1])

3. Umwandlung der Alkohole in die Jodide.

Eine noch genauere Trennung erreicht man durch weitere Fraktionierung der Jodide, in die man die Alkohole umwandelt. Die Siedepunkte dieser liegen, wie aus der Tabelle ersichtlich, in anderen Abständen wie die der Alkohole, wodurch die Separierung begünstigt wird. Zum Nachweis der einzelnen Bestandteile ist die Überführung in die Jodide, die Kontrolle des Siedepunktes dieser und die Jodbestimmung unbedingtes Erfordernis. Nur so kann z. B. der Isopropylalkohol mit dem Siedepunkt von 81°, vom Äthylalkohol mit dem von 78°, durch die Verschiedenheit der Siedepunkte ihrer Jodide 72° und 89° scharf unterschieden werden.

Zur Umwandlung in die Jodide übergießt man in einem Kölbchen 1 Teil roten Phosphors mit 8 Teilen Alkohol und fügt dazu allmählich unter

[1]) Vgl. hierzu *H. Pringsheim,* Über die Unterdrückung der Fuselölbildung und die Mitwirkung von Bakterien an der Bildung höherer Alkohole bei der Gärung. Biochem. Zeitschr. Bd. **10**. S. 490 (1908).

Kühlung 10 Teile gepulvertes Jod. Man setzt dann ein Steigrohr auf und überläßt das Gemisch bis zum anderen Tage sich selbst. Nachdem man zur Vollendung der Reaktion noch 2 Stunden am Rückflußkühler erhitzt hat, destilliert man am absteigenden Kühler ab. Das durch Jod braun gefärbte Destillat wird im Scheidetrichter mit verdünnter Natronlauge gewaschen und mit Chlorcalcium getrocknet. Zu der nach *Carius* auszuführenden Jodbestimmung bedient man sich eines eben scharf beim Siedepunkt überdestillierten Anteils, der noch etwas rötlich gefärbt sein darf. Eine Wegnahme dieser durch geringe Jodausscheidung veranlaßten Färbung durch molekulares Silber ist nicht zu empfehlen, da man dadurch meist zu niedrige Jodwerte erhält.

Handelt es sich um einen besonders bedeutungsvollen Nachweis der Alkohole, so kann man diese noch durch ein Chromsäuregemisch in die zugehörigen Säuren überführen und diese in Form ihrer Baryumsalze analysieren.[1]) Gut kann man so normalen und Isobutylalkohol durch die Schwerlöslichkeit des n-buttersauren Kalks in warmem Wasser unterscheiden.

Trotzdem die geschilderte Methode keine scharf quantitative Trennung der Alkohole gestattet, ist sie doch die einzig verläßliche. Speziell sei hier vor der auch in neuerer Zeit noch manchmal bei biologischen Untersuchungen in Anwendung gebrachten Methode von *Duclaux*[2]) gewarnt, die die Messung der Alkohole eines Gemisches durch die Zahl der aus einer Kapillare ausfließenden Tropfenanzahl anstrebt. Ohne vorherige Separierung und genaue Identifizierung der Alkohole ist die Methode unanwendbar; sie kann überhaupt nur bei Anwesenheit von nicht mehr als zwei Alkoholen Verwendung finden und gibt dann Resultate, deren Sicherheit bisher nicht durch genügende Nachprüfung verbürgt ist.

Methode der Fuselölbestimmung.

Die Methode zur Bestimmung der bei der Gärung gebildeten höheren Alkohole hat über die Grenzen ihrer praktischen Bedeutung hinaus theoretisches Interesse gewonnen, nachdem durch die Untersuchungen von *Ehrlich*[3]) gezeigt wurde, daß Aminosäuren, speziell Leuzin, bei der alkoholischen Hefegärung in Alkohole, speziell in Amylalkohol, übergeführt werden. Auch gärende Schimmelpilze können diese Umwandlung bewirken.[4]) Man kann so durch Messung des Fuselöls in dem bei der Gärung gebildeten Alkohol einen Einblick in die Lebensfunktionen der Gärungsorganismen gewinnen und den zeitlichen wie durch verschiedene Bedingungen beeinflußten Angriff auf die Stickstoffnahrung verfolgen.[5])

---

[1]) Vgl. hierzu *H. Pringsheim*, Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. **15**. S. 318 (1905).

[2]) *E. Duclaux*, Sur la séparation de liquides melangés. Annales de Chimie et de Physique. (Série V.) T. **7**. p. 273 (1876).

[3]) *F. Ehrlich*, Über die Entstehung des Fuselöls. Zeitschr. des Vereins der Deutschen Zuckerindustrie. Jg. **55**. S. 539 (1905).

[4]) *H. Pringsheim*, Über die Fuselölbildung durch verschiedene Pilze. Biochem. Zeitschr. Bd. **8**. S. 128 (1908).

[5]) *H. Pringsheim*, Der Einfluß der Stickstoffernährung auf die Bildung der Nebenprodukte, speziell des Fuselöls, bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Zeitschr. III. 3. Teil. S. 225 (1907). — *F. Ehrlich*, Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **40**. S. 1027 (1907).

Schon im Jahre 1896 konnte eine Zusammenstellung von mehr als 300 Arbeiten über diese Untersuchungsmethode gemacht werden.[1] Jetzt kommt neben der amtlich eingeführten *Röse*schen Methode[2]), auf deren Mängel ich früher schon eingegangen bin[3]), nur das Verfahren von *E. Beckmann*[4]) in Betracht. Es beruht auf der Trennung der höheren Alkohole vom Äthylalkohol durch Ausschütteln der mit Chlorcalcium gesättigten Lösung mit Tetrachlorkohlenstoff, Überführung der höheren Alkohole durch Veresterung in die Nitrite und Titration der in Freiheit gesetzten salpetrigen Säure, deren Quantität dann die Menge der vorhandenen Alkohole anzeigt, mit Kaliumpermanganat.

Die Fehlergrenze der Methode, die durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren, wie der ungenügenden Trennung der Alkohole, des Angriffs von Permanganat auf die Alkohole selbst und die Berechnung der gefundenen Werte auf Amylalkohol zustande kommt, beträgt im Höchstfalle $\pm 10\%$. Im allgemeinen werden bessere Resultate gewonnen und gute Übereinstimmung zwischen den einzelnen Bestimmungen des Fuselöls, im selben Alkohol erzielt.[5]) 0·0808 *g* abgewogener Amylalkohol wurde als 0·08310 *g* analysiert, also 103·7% der Theorie.[6]) Man kann die Methode auch anwenden, um zu prüfen, ob überhaupt Fuselölbildung eintrat. Eine 15·92%ige alkoholische amylalkoholfreie Lösung zeigte als untere Fehlergrenze 0·0058 *g* Fuselöl an.[7])

Zur Bestimmung versetzt man 50 *cm*³ der zu untersuchenden, vorher destillierten, alkoholischen Flüssigkeit, welche nicht mehr als 40% Alkohol enthalten darf, mit 25 *g* Calciumchlorid. Unter Umschütteln und Kühlen erfolgt leicht Lösung. Die Lösung wird kurze Zeit, eine halbe Minute genügt, mit 25 *cm*³ Tetrachlorkohlenstoff kräftig im Scheidetrichter (250 *cm*³ Inhalt) durchgeschüttelt. Nach dem Absetzen wird der Tetrachlorkohlenstoff in einen anderen Scheidetrichter abgelassen, der 50 *cm*³ gesättigte Calciumchloridlösung enthält. Die alkoholische Lösung wird dann noch 3mal mit je 25 *cm*³ Tetrachlorkohlenstoff kräftig durchgeschüttelt und nach dem Absetzen des Tetrachlorkohlenstoffs jedesmal in den zweiten Scheidetrichter abgelassen.

Der gesamte Tetrachlorkohlenstoff wird dann mit dem Chlorcalcium kräftig durchgeschüttelt und wieder in den ersten ausgewaschenen Scheidetrichter abgelassen, der ebenfalls 50 *cm*³ Chlorcalciumlösung enthält. Die ersten 50 *cm*³ Chlorcalcium werden mit je 10 *cm*³ Tetrachlorkohlenstoff nachgeschüttelt und diese mit der Gesamtmenge vereinigt. Mit den zweiten 50 *cm*³ Calciumchlorid wird wieder geschüttelt. Zusammenfassend besteht

---

[1]) *W. D. Bigelow,* Journ. of the American Chemical Soc. Vol. **18**. p. 397 (1906).

[2]) Anweisung zur Bestimmung des Gehaltes der Branntweine an Nebenerzeugnissen der Gärung und Destillation. Zentralbl. für das Deutsche Reich. Nr. **95**. S. 305 (1895) und Alkoholermittlungsordnung. Berlin 1900. Julius Springer. S. 15.

[3]) l. c. Bd. 3. S. 233 (1907).

[4]) *E. Beckmann,* Zur Bestimmung des Fuselölgehaltes alkoholischer Flüssigkeiten. Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel. Bd. **10**. S. 143 (1905).

[5]) *H. Pringsheim,* l. c. III. S. 238 und folgende Seiten. 1907.

[6]) Ibid. S. 235.

[7]) *H. Pringsheim,* Über die Bildung von Fuselöl bei Acetondauerhefegärung. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **39**. S. 3713 (1906).

die Trennung also darin, daß zunächst durch einmaliges Schütteln mit je 25 cm^3 Tetrachlorkohlenstoff der Amylalkohol der alkoholischen Flüssigkeit entzogen wird. Durch viermaliges Schütteln mit je 50 cm^3 Calciumchloridlösung wird dann der mit aufgenommene Alkohol aus dem Tetrachlorkohlenstoff entfernt, wobei durch Nachschütteln der beiden ersten 50 cm^3 Calciumchloridlösung mit je 10 cm^3 Tetrachlorkohlenstoff größeren Verlusten an Amylalkohol vorgebeugt wird.

Zur Veresterung der nun im Tetrachlorkohlenstoff enthaltenen Alkohole fügt man zu der noch feuchten Lösung 3 *g* Natriumnitrit und 6 *g* Natriumdisulfat, beide in gepulvertem Zustande. Es entwickelt sich bald salpetrige Säure, so daß der Tetrachlorkohlenstoff nach einigem Stehen gelblich gefärbt wird. Um den Überschuß der salpetrigen Säure zu entfernen, schüttelt man den Tetrachlorkohlenstoff jetzt im Scheidetrichter mit 75 cm^3 gesättigter Sodalösung durch und wäscht einmal mit Wasser nach. Um die salpetrige Säure aus den Estern in Freiheit zu setzen, schüttelt man die Lösung dann mit 25 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und läßt Säure und Tetrachlorkohlenstoff, unter Nachwaschen mit Wasser, gemeinsam in ein Becherglas laufen, das 100 cm^3 Wasser und einen Teil der zur Titration zu verwendenden $^1/_{10}$-Normalpermanganatlösung enthält. Diese hält man durch Nachfließenlassen aus der Bürette immer im Überschuß, was sich durch die violette Färbung der Lösung zu erkennen gibt. Nach 5 Minuten langem Stehen titriert man mit einer auf die Permanganatlösung so eingestellten schwach schwefelsauren Eisenferroammoniumsulfatlösung, daß 10 cm^3 dieser etwa 10 cm^3 der Permanganatlösung entsprechen, zurück. Der Titer der Permanganatlösung wird auf Eisen eingestellt. Bei der Umrechnung auf Amylalkohol entspricht 0·1 *g* Fe oder die entsprechende Menge Kaliumpermanganat 0·078658 *g* Amylalkohol.

Der gebrauchte Tetrachlorkohlenstoff wird zuerst eine Zeitlang unter einer Permanganatlösung stehen gelassen, dann durch zweimaliges Schütteln mit konzentrierter Schwefelsäure, Nachschütteln mit Wasser, verdünnter Natronlauge und wieder mit Wasser, Entwässern mit Chlorcalcium und schließliche Destillation gereinigt, ehe er von neuem zur Analyse verwandt werden kann. Auf dieselbe Weise bereitet man auch den billigen Tetrachlorkohlenstoff der Technik vor, dessen man sich dann gut zur Fuselölbestimmung bedienen darf.

Nachweis und Bestimmung der biologisch wichtigen Aldehyde.

Von **Hans Pringsheim**, Berlin.

Für den Nachweis und die Bestimmung der Aldehyde kommen bei biologischen Prozessen hauptsächlich Formaldehyd und Acetaldehyd in Betracht. Ersterer wurde häufig als Zwischenprodukt bei der Kohlensäureassimilation im Chloroplasten der Pflanzen gesucht.[1] Der Acetaldehyd entsteht bei der alkoholischen Gärung, voraussichtlich als Oxydationsprodukt des Alkohols[2]; die nächsthöheren Aldehyde von der dritten bis zur sechsten Kohlenstoffreihe sind in der Natur kaum beobachtet worden. Die Aldehyde der höheren Reihen, wie Oenanthol, Caprylaldehyd, Pelargonaldehyd, Caprinaldehyd, Laurinaldehyd und Myristinaldehyd, müssen zum Nachweis isoliert und durch die gewöhnlichen Methoden der Elementaranalyse charakterisiert werden.[3] Wir beschränken uns daher hier auf den Nachweis und die Bestimmung von Form- und Acetaldehyd, die jetzt so gut ausgearbeitet sind, daß diese Aldehyde in Zukunft mit gutem Erfolge bei biologischen Prozessen gesucht und bestimmt werden können.

Formaldehyd, $H-C\begin{smallmatrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{smallmatrix}$, ist bei gewöhnlicher Temperatur ein Gas, das sich bei -21^0 zu einer wasserhellen Flüssigkeit verdichtet. Seine uns hier ausschließlich interessierende wässerige Lösung riecht sehr stechend.

Acetaldehyd, $CH_3-C\begin{smallmatrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{smallmatrix}$, gewöhnlich „Aldehyd“ schlechthin genannt, ist eine farblose, sehr bewegliche Flüssigkeit, die schon bei 21^0 siedet und sich mit Wasser in jedem Verhältnis mischt.

Nachweis der Aldehyde.[4]

Zum Nachweis der Aldehyde eignet sich

1. die Reduktion ammoniakalischer Silberlösung, bei der sich ein Silberspiegel abscheidet;

---

[1] Neuere Literatur. Vgl. *Czapek,* Biochemie der Pflanzen. Bd. **1**. S. 503. Jena 1905/07.

[2] Vgl. *Bau* in *Lafars* Handb. d. techn. Mykologie. Bd. **4**. S. 386.

[3] Vgl. *Meyer-Jacobson,* Lehrb. d. organ. Chemie. Bd. I_1. S. 716. Leipzig 1907.

[4] Vgl. *Viktor Meyer-Jacobson,* l. c. S. 680.

2. die rotviolette Färbung, welche beim Versetzen einer durch schweflige Säure entfärbten Fuchsinlösung mit Aldehyd auftritt. Die Reaktion wird jedoch auch von einigen Ketonen hervorgerufen;

3. für alle Aldehyde, welche in alkalischer Lösung einigermaßen beständig sind, ist folgende Reaktion sehr charakteristisch: Zu einer frisch bereiteten Lösung von Diazobenzolsulfonsäure in etwa 60 Teilen kaltem Wasser und etwas Natronlauge fügt man die mit verdünntem Alkali vermischte Substanz und einige Körnchen Natriumamalgam und läßt ruhig stehen; nach kurzer Zeit tritt rotviolette Färbung ein.

Noch verläßlicher als vorgenannte Reaktionen ist die Isolierung spezieller Verbindungen der Aldehyde; da wir aber für die uns hier interessierenden Aldehyde besondere Methoden angeben, soll dieses Verfahren hier nur erwähnt werden.

Unterscheidung des Formaldehyds von anderen Aldehyden, speziell Acetaldehyd.[1]) Löst man 1 *g* Mercurioxyd in der Wärme in einer 5%igen Natriumsulfitlösung, so ruft die Gegenwart einer geringen Menge von Acetaldehyd bei Zusatz einer sehr verdünnten alkalischen Lösung schon in der Kälte einen weißen, dichten Niederschlag hervor. Zuviel Alkali ist zu vermeiden; auch die Aldehydlösung muß genügend verdünnt werden. Der Niederschlag ist unlöslich in Wasser und Alkohol und bildet unter dem Einfluß von viel Jod in der Wärme Jodoform. Er löst sich nicht in verdünnter Schwefelsäure, dagegen in Cyankalilösung. Das Mercurichlorid kann in der Bereitung des Reagenz das Oxyd vertreten. Alkohol beeinträchtigt die Reaktion in genügender Verdünnung nicht. Aceton gibt sie erst, wenn durch Erhitzen aufgespalten wird.

Die Reaktion ist charakteristisch für Aldehyde, die die Gruppe $—CH_2—COH$ enthalten, also nicht für Formaldehyd, den man auf diese Weise von den anderen Aldehyden, im besonderen Acetaldehyd, unterscheiden kann.

Nachweis von Formaldehyd.[2])

1. Die folgende Farbenreaktion ist für den Nachweis von Formaldehyd äußerst empfindlich, aber sie ist, wie alle solchen Reaktionen, nicht absolut zuverlässig.

Als Reagenz benutzt man eine Resorzinnatronlauge von 40—50% Natriumhydrat und 5% Resorzin. Gleiche Volumina dieser Lauge und der zu untersuchenden Flüssigkeit, die frei von Farbstoffen und Eiweißkörpern sein muß, werden im Reagenzrohr zum Sieden erhitzt und kurze Zeit (bis zu einer halben Minute) siedend erhalten. Selbst bei Gegenwart sehr geringer Mengen von Formaldehyd tritt deutliche Rotfärbung ein. Die Grenze der Empfindlichkeit für reine wässerige Lösungen ist $^1/_5$ bis $^1/_{10}$ Milliontel.

[1]) *A. Leys*, Chem. Zentralbl. Jg. **1905**. II. S. 855. Journ. de pharm. et de chim. (VI. Bd. **22**. S. 107 (1905). Wirkung der Aldehyde auf das Mercurioxyd in alkalischen Mitteln, Unterscheidung von Formaldehyd und Acetaldehyd.

[2]) *Lebbin*, Zum Nachweis des Formaldehyds. Pharm. Ztg. Bd. **42**. S. 18 (1897).

Die Reaktion soll außer Formaldehyd nur dem Chloroform und Substanzen, die mit Lauge Chloroform abscheiden, zukommen.

2. Zuverlässiger, wenn auch nicht so scharf wie vorstehende Farbenreaktion, ist die Kondensation des Formaldehyds mit p-Dihydrazinodiphenyl, welches mit ihm ein charakteristisches Hydrazon von der Formel

$$\begin{array}{l} C_6H_4 . H . N . N = CH_2 \\ | \\ C_6H_4 . H . N . N = CH_2 \end{array}$$

bildet.[1])

Zu einer ganz farblosen, nötigenfalls mit Tierkohle völlig entfärbten wässerigen Lösung des p-Hydrazinodiphenylchlorhydrats setzt man bei 60° langsam unter Rühren die zu untersuchende Flüssigkeit. Die Lösung erfüllt sich bald mit einem voluminösen hellgelben Niederschlag, der sich rasch absetzt. Man wäscht an der Saugpumpe nacheinander mit viel heißem Wasser, Alkohol, Aceton, absolutem Alkohol und wasserfreiem Äther. Nur so behält die Substanz auch nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure ihre dem Phenylglukosazon gleichende Farbe. Im Kapillarrohr färbt sich die Substanz bei 160° orange, sintert bei etwa 202° und schmilzt unscharf bei 220° zu einer rotbraunen Masse, die sich bei 240° langsam zersetzt.

Die beschriebene Verbindung entsteht noch in Formaldehydlösungen von großer Verdünnung. Solche von 1 : 5000 färben sich beim Erwärmen mit einigen Tropfen der Lösung des salzsauren Diphenyldihydrazins momentan hellgelb; bis zur kristallinischen Abscheidung des Niederschlags muß man hier jedoch einige Minuten warten. Bei Verdünnung von 1 : 8000 wird die Probe unsicher.

Andere Aldehyde oder Ketone geben mit salzsaurem Diphenyldihydrazin in gehöriger Verdünnung überhaupt keine oder in Alkohol leicht lösliche Verbindungen. Man setzt daher zu der zu prüfenden Flüssigkeit, wenn andere Aldehyde oder Ketone zu vermuten sind, das doppelte Volumen Alkohol, wodurch die Schärfe der Reaktion nicht beeinträchtigt wird. Ist wenig Formaldehyd neben vielen anderen Alkoholen und Ketonen zugegen, so kocht man die durch das Hydrazinsalz gefällte Verbindung mit starkem Alkohol aus, bis der Rückstand rein gelb ist.

Für den rein qualitativen Nachweis ist die Reindarstellung des Hydrazinchlorhydrates nicht erforderlich. Es genügt, in einem Reagenzglas eine Messerspitze Benzidin in Salzsäure zu lösen, nach dem Erkalten unter Kühlung mit fließendem Wasser mit Nitrit zu versetzen und das Diazochlorid zu einer Lösung von Zinkchlorür in rauchender Salzsäure zu fügen. Nach kurzem Stehen kocht man mit Tierkohle auf. Das klare Filtrat enthält genügend Hydrazinchlorhydrat, doch nimmt die Formaldehydverbindung dann manchmal einen orangeroten Farbenton an.

---

[1]) *C. Neuberg,* Zur Erkennung und Bestimmung des Formaldehyds. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 189, 1899, 1901.

Die Methode ist bei Verwendung des kristallisierten reinen Hydrazinreagenz zur quantitativen Bestimmung von Formaldehyd in Gegenwart anderer Aldehyde und Ketone geeignet, worüber man das Original vergleiche.

Nachweis von Acetaldehyd.

(Prüfung auf Aldehyd in alkoholischen Flüssigkeiten.)

400—500 cm^3 der zu untersuchenden Flüssigkeit werden in eine chemisch reinen Alkohol enthaltende Vorlage so abdestilliert, daß die ersten Anteile, auch die übergehende Luft, in den Alkohol geleitet wird. Die eine Hälfte des Destillates, mit ammoniakalischer Silberlösung erwärmt, läßt bei Ausscheidung eines schwarzen Niederschlages auf Aldehyd schließen. Zur Sicherheit prüft man die andere Hälfte des Destillates [1]), indem man zu demselben in einer weißen Porzellanschale tropfenweise von einer frisch bereiteten 10%igen Lösung von reinstem Metaphenylendiamin gibt. Aldehyd erzeugt in 2—4 Minuten an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten eine gelbrote Zone; es ist jedoch zu beachten, daß in länger als 5 Minuten dieselbe Reaktion auch bei reinem Alkohol eintritt. Mit vorgenanntem Reagenz läßt sich noch die Anwesenheit von 1 : 100.000 Volumen Acetaldehyd erkennen.

Bestimmung des Formaldehyds. [2])

a) In rein wässeriger Lösung bei Abwesenheit anderer Aldehyde und Ketone.

Die jodometrische Bestimmungsmethode beruht auf der Oxydierbarkeit des Formaldehyds in alkalischer Lösung, die er seiner Aldehydfunktion verdankt. [3])

Die zu untersuchende Flüssigkeit bringt man in eine Stöpselflasche mit gut eingeriebenem Glasstopfen und fügt schnell 30 cm^3 Normalnatronlauge hinzu, die man nur mit dem Meßzylinder abzumessen braucht. Zugleich läßt man unter beständigem Umschwenken aus einer Bürette etwa 50 cm^3 $^1/_5$-Normaljodlösung zufließen, bis die Flüssigkeit lebhaft gelb erscheint. Man verstopft die Flasche, schüttelt noch eine halbe Minute lang gut um, säuert mit 40 cm^3 Normalschwefelsäure (im Meßzylinder gemessen) an und titriert nach kurzem Stehen, während dessen die Flasche verstopft bleibt, den Überschuß des Jods mit $^1/_{10}$-Normalnatriumthiosulfatlösung zurück. Zwei Äquivalente verbrauchten Jods entsprechen einem Äquivalent Formaldehyds. 1 cm^3 $^1/_{10}$-Normaljodlösung entspricht 0·7333 *mg* Formaldehyd.

[1]) *Windisch,* Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1896. S. 19.

[2]) Über zahlreiche Methoden zur Formaldehydbestimmung vgl. *Meyer-Jacobson,* l. c. S. 703.

[3]) *G. Romijn,* Über die Bestimmung des Formaldehyds. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **36.** S. 18 (1897). Verbessert von *Fresenius* und *Grünhut,* Zur Handelsanalyse von Formaldehyd. Ibid. Bd. **44.** S. 13 (1905).

Auf sorgsames Arbeiten, feine Büretten, jodatfreies Jodkalium und nitritfreie Natronlauge ist zu achten.

b) Bei Anwesenheit von Acetaldehyd bzw. Aceton- oder Benzaldehyd.

Die Cyankaliummethode beruht auf der Eigenschaft des Formaldehyds, das Cyankalium sofort zu addieren. In salpetersaurer Lösung wird von einem Äquivalent Formaldehyds 1 Äquivalent Cyankalium gebunden. Ein Überschuß von Cyankalium wird durch Silbernitrat ausgefällt und der Rest der zugesetzten Silberlösung mit Rhodanammon nach *Volhard* zurücktitriert. Das Resultat ist folgendes: Je größer die Menge des Formaldehyds, desto mehr Cyankali wird verbraucht, desto weniger Silberlösung bleibt zurück und desto größere Mengen von Rhodanammon sind zur endlichen Titration nötig; d. h. je mehr Formaldehyd in der zu untersuchenden Flüssigkeit war, desto mehr Rhodanammonlösung müssen bis zur Rottfärbung (Eisenalaun als Indikator) zugesetzt werden.

Bedient man sich einer $^1/_{10}$ Normalsilberlösung, so stellt man sich die Cyankalilösung durch Lösen von 3·1 *g* 96$^0/_0$igem Cyankali in 500 *cm*^{3} Wasser her. Der Gehalt dieser Lösung an Cyankali, welcher nicht ganz das Äquivalent der Silberlösung ausmacht, wird dadurch bestimmt, daß man 10 *cm*^{3} $^1/_{10}$-Normalsilberlösung in einem 50 *cm*^{3} fassenden Meßkolben mit 2 Tropfen 50$^0/_0$iger Salpetersäure versetzt und dazu 10 *cm*^{3} der Cyankaliumlösung gibt. Man füllt auf 50 *cm*^{3} mit destilliertem Wasser auf, filtriert nach dem Umschütteln durch ein trockenes Filter und verwendet 25 *cm*^{3} der Flüssigkeit zur Bestimmung des Überschusses an Silbernitrat durch Titration mit $^1/_{10}$ Normalrhodanlösung. Dazu werden z. B. 0·195 *cm*^{3} Rhodanlösung verbraucht; für die ganze Flüssigkeitsmenge also 0·39 *cm*^{3}. Folglich sind für je 10 *cm*^{3} Silberlösung 0·39 *cm*^{3} Rhodanlösung abzuziehen, ehe man zur Berechnung des gefundenen Wertes für Formaldehyd schreitet.

Zur Bestimmung wird die Formaldehydlösung mit der gemessenen Menge eines Überschusses von Cyankali versetzt, und diese vereinigten Lösungen zu einem gemessenen Volumen Silberlösung gegeben. Dann wird, wie bei der Bestimmung des Cyankaligehaltes angegeben, verfahren. Wurden z. B. 20 *cm*^{3} $^1/_{10}$-Normalsilberlösung angewandt und zur Formaldehydlösung 20 *cm*^{3} Cyankalilösung gegeben und schließlich 12·5 *cm*^{3} Rhodanlösung verbraucht, so wäre die gefundene Formaldehydmenge die äquivalente Menge, welche (12·5 — 2 . 0·39 *cm*^{3}) = 11·48 $^1/_{10}$-Normalrhodanlösung entspricht. $^1/_{10}$-Normalrhodanlösung ist 3 *mg* Formaldehyd äquivalent.[1])

Wird die Aldehydcyankaliumlösung sofort nach dem Vermischen zur Silberlösung gegeben, so tritt nur der Formaldehyd mit dem Cyankali in Reaktion. Der Acetaldehyd reagiert erst nach längerem Stehen mit dem Cyankali. Daher gelingt es, den Formaldehyd auch in Gegenwart von Acetaldehyd, höheren Aldehyden und von Aceton zu bestimmen.

[1]) Die sehr unklare Beschreibung der Methode findet sich bei *Romijn*, l. c. S. 21.

Bestimmung von Acetaldehyd in alkoholischen Flüssigkeiten.

Zur Bestimmung von Acetaldehyd in alkoholischen Flüssigkeiten sind verschiedene koloristische Verfahren angegeben worden, auf die hier nur hingewiesen werden kann.[1])

Hier sei folgendes chemische Verfahren erwähnt:

Aldehyde reagieren in folgender Weise mit Natriumsulfit:

$$R.COH + 2H_2O + 2Na_2SO_3 = R.COH(NaHSO_3)_2 + 2NaOH;$$

indem man die gebildete Natronlauge titriert, kann man den Aldehyd bestimmen.[2])

Man neutralisiert die zu untersuchende Flüssigkeit, setzt Rosolsäure als Indikator zu, gibt dann 25 bzw. 50 cm^3 einer ebenfalls neutralen 20%igen Natriumsulfitlösung zu und titriert unter Erhitzung unter häufigem Schütteln mit $^1/_2$-Normalsalzsäure bis die alkalische Reaktion verschwunden ist. Aus der Menge der gefundenen Natronlauge berechnet sich die Menge des vorhandenen Aldehyds. 1 cm^3 $^1/_2$-Normalnatronlauge entsprechen 4·4 *mg* Acetaldehyd. (Diese Methode kann man auch zur Bestimmung von Formaldehyd in Milch benutzen.)

[1]) *Ed. Mohler,* Ein Gang zur Untersuchung von Handelssprit. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **31**. S. 583 (1892). — *J. Paul,* Zum Nachweis von Aldehyd in Alkohol. Ibid. Bd. **35**. S. 647 (1896). — *E. Rieter,* Zur Bestimmung des Aldehyds in alkoholischen Flüssigkeiten. Ibid. Bd. **36**. S. 403 (1897).

[2]) *Samuel S. Sadtler,* Eine basische Reaktion aromatischer und aliphatischer Aldehyde. Chem. Zentralbl. Jg. **1904**. I. S. 1176; Amer. Journ. of pharm. Vol. **76**. S. 84 (1904).

Nachweis und Bestimmung der biologisch wichtigen Säuren.

Von **Hans Pringsheim**, Berlin.

Die Säuren sind in zwei gesonderten Gruppen zu betrachten: 1. als flüchtige Fettsäuren und 2. als nicht flüchtige Oxy- resp. Dikarbonsäuren, da sie auf Grund dieser Eigenschaft zu trennen sind.

Die flüchtigen Fettsäuren.

Eigenschaften der flüchtigen Fettsäuren.

Unter den flüchtigen Fettsäuren kommen Ameisen-, Essig-, Propion-, Buttersäure und höhere molekulare Säuren in Betracht, die mit Wasserdampf destilliert werden können. Sie sind sauer reagierende, bei Zimmertemperatur flüssige Substanzen, die auch im wasserfreien Zustande unzersetzt destilliert werden können.

Nachstehende Tabelle enthält die Zusammensetzung, Konstitution, die Siedepunkte und den Silbergehalt der Silbersalze dieser Säuren.

			Siedpunkte	Prozentgehalt der Silbersalze an Ag
CH_2O_2	Ameisensäure	$H.COOH$	99°	70·6% Ag
$C_2H_4O_2$	Essigsäure	$CH_3.COOH$	118°	63·9% Ag
$C_3H_6O_2$	Propionsäure	C_2H_5COOH	141°	59·0% Ag
$C_4H_8O_2$	Normale Buttersäure	C_3H_7COOH	163°	55·3% Ag
	Iso-Buttersäure . . .	$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!>CH.COOH$	154°	
$C_5H_{10}O_2$	Valeriansäure			
	Isopropylessigsäure	$(CH_3)_2=CH.CH_2COOH$	175°	51·6% Ag
	Methyläthylessigsäure	$\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}\!>CH.COOH$	175°	

Die Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure entstehen bei einer so großen Zahl biologischer Vorgänge, daß deren Aufzählung hier zu weit

führen würde. Die höher molekularen Säuren sind besonders neuerdings bei der Fäulnis aufgefunden worden[1], bei der sie aus stickstoffhaltigen Eiweißabbauprodukten entstehen.[2] Das Vorkommen der Methyläthylessigsäure, der einzig optisch aktiven unter den Valeriansäuren, läßt sich durch die Rechtsdrehung, die sie der Valeriansäurefraktion verleiht, nachweisen. Die Isolierung der Säuren mit mehr Kohlenstoffatomen ist noch zu ungenügend erforscht, als daß sie hier Aufnahme finden könnte.

Nachweis der flüchtigen Fettsäuren.

Der Erkennung oder Bestimmung der Säuren hat immer eine Destillation vorauszugehen. Ist Gefahr vorhanden, daß bei der Destillation durch die Zersetzung anderer Stoffe, wie Eiweiß oder Hämoglobin, z. B. bei der Prüfung des Ventrikelinhaltes, Abspaltung von Fettsäuren erfolgen kann, dann fällt man die Substanzen in neutraler Lösung mit Alkohol, filtriert rasch ab und extrahiert wiederum mit Alkohol. Die alkoholischen Extrakte werden mit Soda schwach alkalisch gemacht und der Alkohol abdestilliert. In anderen Fällen, wie bei der biologischen Bildung von Fettsäuren durch Pilzwirkung, kann man aus der mit Schwefelsäure oder Phosphorsäure angesäuerten Lösung gleich eine dem Volumen gleiche Menge abdestillieren.

In allen Fällen muß man fürs erste von der Voraussetzung ausgehen, daß sich ein Gemenge flüchtiger Fettsäuren gebildet hat. Aus diesem Grunde sind die Methoden ihres Nachweises ohne vorherige Trennung wenig verläßlich.

Am sichersten läßt sich noch die Ameisensäure durch die rasche Schwärzung ihres Silberniederschlages erkennen. Beim Vermischen der Lösung eines Acetates, d. h. also in unserem Falle des genau neutralisierten Destillates, mit Eisenchlorid tritt blutrote Färbung durch die Bildung von Ferriacetat auf und beim Erwärmen fällt ein bräunlicher Niederschlag von basischem Acetat. Die Buttersäure kann man beim Erwärmen der schwefelsauren Lösung am Geruch erkennen und von der Isobuttersäure durch die Schwerlöslichkeit ihres Kalksalzes in warmem Wasser unterscheiden. Zu diesem Zweck wird ein Teil des Destillates oder besser ein Teil der Buttersäurefraktion, deren Isolierung ich später beschreibe, durch Kochen mit Calciumkarbonat und sehr viel Wasser in das Calciumsalz verwandelt und dieses durch Eindampfen im reinen Zustand abgeschieden. Die in der Kälte gesättigte Lösung dieses, vorher noch einmal umzukristallisierenden, Salzes muß sich beim Erwärmen trüben, und das lufttrockene Salz muß ein Molekül Kristallwasser erhalten, wenn normaler buttersaurer Kalk vorliegen soll.

---

[1] *Neuberg* und *Rosenberg*, Über die bei der Eiweißfäulnis auftretenden Fettsäuren sowie über die optisch aktive Valerian- und Capronsäure. Biochem. Zeitschr. Bd. 7. S. 178 (1907).

[2] *W. Brasch* und *C. Neuberg*, Biochemische Umwandlung der Glutaminsäure in n-Buttersäure. Biochem. Zeitschr. Bd. 13. S. 299 (1908).

Trennung der flüchtigen Fettsäuren.

Sind genügende Mengen von Säuren erhalten worden, so ist ihre Trennung den vorgenannten unzuverlässigen Methoden zu ihrem Nachweis vorzuziehen. Die Trennung des Gemisches der Säuren in die einzelnen Bestandteile gibt auch einen guten Anhalt für das quantitative Verhältnis ihrer Beteiligung, wenn auch hier, wie in allen Fällen, in denen es sich um die Scheidung homologer, durch ihre Eigenschaften nahe verwandter Körper handelt, auf große Genauigkeit nicht zu rechnen ist.

Die durch Wasserdampfdestillation freien Säuren werden mit Äther aufgenommen und in ätherischer Lösung über geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des Äthers werden die wasserfreien Säuren nun in derselben Weise, wie vorher bei den Alkoholen beschrieben, einer fraktionierten Destillation unterworfen, wobei schließlich möglichst konstant siedende, der vorstehenden Tabelle entsprechende, Fraktionen zu gewinnen sind. Das Gewicht der einzelnen Fraktionen gibt annähernde Werte für die Quantitäten der vorhandenen einzelnen Fettsäuren.

Die Ameisensäurefraktion kann vernachlässigt werden, da es für diese Säure eine bessere auf ihre Aldehydnatur begründete, nachher zu beschreibende Methode der Bestimmung gibt. Die anderen Fraktionen werden mit Ammoniak übersättigt, der Überschuß des Ammoniaks durch Verdampfen entfernt, der Rückstand in konzentrierter wässeriger Lösung mit Silbernitrat gefällt. Die Silberbestimmung dieser Salze, die durch Glühen im Porzellantiegel auszuführen ist, garantiert die Anwesenheit ihrer entsprechenden Säuren. Beim Erhalten ungenauer Werte muß fraktioniert mit Silbernitrat gefällt werden.

Die Valeriansäurefraktion ist auf ihr optisches Drehungsvermögen zu prüfen, um Methyläthylessigsäure nachzuweisen, deren Prozentgehalt in der Fraktion sich mit einiger Genauigkeit aus dem Grade der Drehung berechnet. Das spezifische Drehungsvermögen der genannten Säure ist $+ 17{\cdot}30^{\circ}$.

Bestimmung der niederen Glieder der flüchtigen Fettsäuren.

Ameisensäure.[1]) Ein Teil der neutralisierten Lösung der flüchtigen Säuren wird mit Quecksilberchlorid (50 *g* $HgCl_2$, 27·5 *g* Natriumacetat im Liter) versetzt, sechs Stunden auf dem Wasserbade erwärmt.

Das $HgCl_2$ wird nach der Gleichung:

$$2\,HgCl_2 + HCOOH = Hg_2Cl_2 + CO_2 + 2\,HCl$$

zu unlöslichem Quecksilberchlorür reduziert und kann für sich auf einem trockenen und gewogenen Filter gesammelt, getrocknet und gewogen werden.

1 Gewichtsteil Hg_2Cl_2 = 0·0976 Gewichtsteile Ameisensäure.

[1]) Nach *Porter* und *Ruyssen*, Dosage volumétrique de l'acide formique. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. T. 82. p. 1504 (1876).

Essigsäure und Buttersäure.[1])

Für die Bestimmung von Essigsäure und Buttersäure nebeneinander hat *K. Windisch*[1]) eine Methode ausgearbeitet, die, falls die Säuren nur in geringer Menge vorliegen, wie z. B. im Wein, viele Vorzüge für sich hat. Die Methode hat aber den Fehler des Vorhandenseins der Propionsäure, die allerdings seltener als die vorgenannten Säuren nachgewiesen wurde, zu vernachlässigen. Sonst gibt sie gute Werte.

Der größte Teil der neutralisierten Fettsäurenlösung wird eingeengt und mit dem gleichen Volumen einer Lösung, die im Liter 90 *g* Kaliumbichromat und 400 *g* konzentrierte Schwefelsäure enthält, erhitzt. Dadurch wird die vorhandene Ameisensäure zu Kohlensäure oxydiert. Die nicht veränderten anderen Säuren (Essigsäure und Buttersäure) werden mit Wasserdampf überdestilliert, wobei man Sorge trägt, daß das Volumen der destillierten Flüssigkeit sich nicht zu sehr vermindert. Das Destillat wird mit $^1/_{10}$-Normalbarytwasser genau titriert, die Lösung der Baryumsalze eingeengt, schließlich in eine Platinschale filtriert, eingedampft, bei 100° getrocknet und gewogen. Dann zerreibt man die trockenen Baryumsalze zu einem feinen Pulver und bestimmt ihren Baryumgehalt, indem man einen abgewogenen Teil im Platintiegel mit Schwefelsäure abraucht und das entstandene Baryumsulfat wägt. Wurden a Gramm des Baryumsalzgemisches angewendet und daraus b Gramm Baryumsulfat erhalten, so enthält die Baryumsalzmischung

$$d = 607{\cdot}63 \,.\, \frac{b}{a} - 455{\cdot}37\%$$

essigsaures Baryum.

Aus dem Verbrauch der Essig- und Buttersäuremischung an $^1/_{10}$-Normalbarytwasser zur Neutralisation und dem Barytgehalt des aus dem Lösungsgemisch hergestellten Baryumsalzgemisches läßt sich der Gehalt der angewendeten Substanzmengen an freier Essigsäure und Buttersäure berechnen. Bedeutet

c die Anzahl von $^1/_{10}$-Normalbarytwasser, die zur Neutralisation der Essig- und Buttersäure (also nach Zerstörung der Ameisensäure durch das Chromsäuregemisch) erforderlich war,

d die Prozente essigsaures Baryum in der Baryumsalzmischung (vorher berechnet), so erhält die angewandte Substanzmenge

$$x = \frac{0{\cdot}0027 \,.\, d \,.\, c}{36{\cdot}51 + 0{\cdot}088\, d} \text{ g . Essigsäure,}$$

$$y = 1{\cdot}18178 \,.\, \frac{100 - d}{d} \text{ g . Buttersäure.}$$

---

[1]) *K. Windisch*, Beiträge zur Kenntnis der Edelbranntweine. Zeitschr. f. d. Untersuchung der Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 8. S. 470 (1904).

Die nichtflüchtigen Säuren.

Bernsteinsäure, Milchsäure,
Oxalsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure.

Bernsteinsäure.

Eigenschaften. Die gewöhnliche Bernsteinsäure von der Zusammensetzung $C_4H_6O_4$ und der Formel

$$\begin{array}{l} CH_2 - COOH \\ | \\ CH_2 - COOH \end{array}$$

ist eine weiße, in kleinen Säulen oder Tafeln kristallisierende Substanz vom Schmelzpunkt 182°, die in Wasser löslich ist. (100 Teile Wasser von 14·5° lösen 5·14 Teile Bernsteinsäure.) Die Lösung reagiert stark sauer.

Die Bernsteinsäure bildet sich bei verschiedenen biologischen Prozessen, so bei der alkoholischen Gärung als Nebenprodukt [1]), bei der Fäulnis [2]) und durch die Tätigkeit zahlreicher Bakterien. [3]) Über ihr Vorkommen im tierischen Körper, im Darm, in der Milz, in Transsudaten, ihren Übergang in den Harn und den Schweiß finden sich verstreute Angaben. [4])

Nachweis der Bernsteinsäure. Für den Nachweis der Bernsteinsäure kommt die Fällung ihrer mit Ammoniak neutralisierten Lösung mit Eisenoxydsalzen in Betracht, wobei basisches Ferrisalz niedergeschlagen wird. Diese Probe ist aber natürlich in Gegenwart anderer Säuren und bei geringen Substanzmengen wenig verläßlich.

Weit sicherer gelingt der Nachweis mit Hilfe der überaus empfindlichen Pyrrolreaktion. [5])

Man engt die auf Bernsteinsäure zu untersuchende Flüssigkeit nach Zusatz einiger Kubikzentimeter Ammoniaklösung im Reagenzglas auf 1 cm^3 ein, fügt dann noch 1 *g* käuflichen Zinkstaubs hinzu, der die Flüssigkeit aufsaugt und die gleichmäßige Verteilung derselben bewirkt, und glüht. Die entweichenden Dämpfe färben dann bei Anwesenheit von Bernsteinsäure entsprechend deren Menge, Fichtenspäne (Streichhölzer) hell- oder dunkelrot, wenn diese, mit starker Salzsäure befeuchtet, in die Reagenzglasöffnung gehängt werden. Dabei ist die Vorsicht zu gebrauchen, die Fichtenspäne erst nach Vertreibung des überschüssigen Ammoniaks in die Dämpfe einzuführen, um die Neutralisation der Säure zu vermeiden.

Befindet sich die Bernsteinsäure in der zu untersuchenden Lösung nicht als freie Säure, sondern an Metall gebunden, so läßt sie sich in vielen Fällen (Erdalkalien, Schwermetallsalz) genau so nachweisen. Ganz sicher ge-

---

[1]) Literatur bei *Bau* in *Lafar*, Handb. d. techn. Mykologie. Bd. **4**. S. 381. Jena 1905/07.

[2]) Literatur bei *Hahn* und *Spieckermann* in *Lafar*, l. c. Bd. **3**. S. 107.

[3]) Vgl. *Lafar*, l. c. Bd. **2**.

[4]) Vgl. *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chemie. 5. Auflage. Wiesbaden. J. F. Bergmann. 1904.

[5]) *C. Neuberg*, Über den Nachweis der Bernsteinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 574 (1900).

lingt ihre Auffindung, wenn man die Umwandlung in das Ammonsalz durch Ammoniumphosphat bewirkt, indem man zu der mit Ammoniak auf ein kleines Volumen eingedampften Flüssigkeit vor Zugabe des Zinkstaubs einige Kristalle von phosphorsaurem Ammon fügt.

Ebenso läßt sich der Nachweis der Bernsteinsäure in Niederschlägen (Silbersalz) führen, indem man unbekümmert um etwaige feste Ausscheidungen genau nach der gegebenen Vorschrift verfährt.

Albumin, Hämin- und Indolderivate geben auch die Pyrrolreaktion. Über die Trennung der Bernsteinsäure von ihnen durch ihre Extraktion mit Äther vergleiche man das Original.

Bestimmung der Bernsteinsäure.

1. In Abwesenheit von Wein- und Äpfelsäure

kann man auf verhältnismäßig einfache Weise verfahren.[1] Nachdem man den Alkohol und die flüchtigen Säuren durch Wasserdampfdestillation verjagt hat, wird der Rückstand auf dem Wasserdampf stark eingedampft, kräftig mit Salpetersäure angesäuert und zur Extraktion der Bernsteinsäure neunmal mit 86%igem Alkohol dreiviertel Stunden am Rückflußkühler ausgekocht. Die alkoholische Lösung wird sodann mit Kalkmilch im Überschuß erhitzt und nach dem Erkalten filtriert. Zur Bernsteinsäurebestimmung wäscht man den Niederschlag mit 86%igem Alkohol, löst in Salpetersäure und extrahiert erschöpfend im Scheidetrichter mit einem Gemisch von 1 Teil 86%igem Alkohol und $1^1/_2$ Teilen Äther. Nach Verjagen der Lösungsmittel wird der Rückstand mit Kalilauge genau neutralisiert und das bernsteinsaure Silber mit Silbernitrat ausgefällt. Das bernsteinsaure Silber, welches nachweislich noch mit etwas Silberchlorid, etwas Silber und Spuren von Silberphosphat verunreinigt ist, wird auf getrocknetem Filter gewogen. zur Kontrolle kann man den Niederschlag im Porzellantiegel veraschen und die Reinheit des gewogenen bernsteinsauren Silbers durch Wägung des metallischen Silbers kontrollieren.

Bei Zusatz von 0·7 *g* Bernsteinsäure zu einem Hefepreßsaft wurden auf die geschilderte Weise 0·5 *g* als bernsteinsaures Silber gewogene Bernsteinsäure wiedergefunden. Die Genauigkeit der Methode ist daher eine geringe.

2. In Gegenwart von Wein- und Äpfelsäure.

Für die Bestimmung der Bernsteinsäure besitzen wir eine zwar weit umständlichere, dafür aber genauere Methode[2], die auch in Gegenwart anderer nichtflüchtiger Säuren, wie Wein-, Äpfel- und Milchsäure, zum Ziele führt, die die Anwendung obiger abgekürzter Methode unmöglich macht.

---

[1]) *Buchner* und *Rapp*, Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. **34**. S. 1528 (1901).

[2]) *R. Kunz*, Bestimmung der Bernsteinsäure im Wein, nebst Bemerkungen über die Bestimmung der Äpfelsäure und der Milchsäure im Wein. Zeitschr. f. die Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. Bd. **6**. S. 721 (1903).

Das Verfahren beruht im wesentlichen auf der völligen Unlöslichkeit des bernsteinsauren Baryts in Alkohol von vorgeschriebener Konzentration, der völligen Zerstörung der gleichfalls in dem Barytniederschlag befindlichen Wein- und Äpfelsäure durch Permanganat in schwefelsaurer Lösung und der beinahe quantitativen Extrahierbarkeit der Bernsteinsäure aus wässeriger Lösung durch Äther, was in der zitierten Arbeit durch eingehende Versuche vertrauenswert nachgewiesen wird.[1])

150 *cm*³ der zu untersuchenden Flüssigkeit (z. B. Wein) werden auf dem Wasserbade auf etwa 100 *cm*³ eingedampft und nach dem Erkalten mit 4 *g* (bei Rotwein 5 *g*) gepulvertem Baryumhydroxyd versetzt, welches man durch Umrühren möglichst zur Lösung bringt. Sodann fügt man 3 *cm*³ Chlorbaryumlösung (1:9) hinzu, bringt die Flüssigkeit samt Niederschlag in einen Meßkolben, füllt wieder auf und filtriert den Niederschlag ab.

100 *cm*³ des Filtrates werden in einem Glaskolben am Rückflußkühler etwa 10 Minuten lang erhitzt, wobei zu beachten ist, daß anfänglich starkes, dann aber bald nachlassendes Schäumen der Flüssigkeit eintritt. Nach dem Erkalten wird Kohlensäure eingeleitet. Den Inhalt des Kolbens bringt man in eine Porzellanschale (die an der Gefäßwand des Kolbens anhaftenden Anteile löst man durch Zusatz von 2—3 Tropfen Salzsäure) und dampft auf dem Wasserbade bis zur Sirupdicke ein.

Der Abdampfungsrückstand wird mit 20 *cm*³ Wasser aufgenommen und unter Umrühren mit 80 *cm*³ 95%igem Alkohol versetzt. Nach 1- bis 2stündigem Stehen wird der entstandene Niederschlag mit der Saugpumpe abfiltriert, mit Alkohol gewaschen und mit Hilfe eines Platinspatels und durch Abspritzen mit ein wenig heißem Wasser vom Filter zurück in die Schale gebracht. Der Niederschlag wird nun mit etwa 50 *cm*³ Wasser angerührt, mit 15 *cm*³ verdünnter Schwefelsäure (1:4) zersetzt und auf dem Wasserbade erhitzt.

In die heiße Flüssigkeit läßt man sodann anfangs in kleinen, später in größeren Mengen 5%ige Permanganatlösung zufließen, bis die Flüssigkeit dunkelrot gefärbt erscheint, und die Rotfärbung auch bei weiterem, 3—5 Minuten langem Erhitzen auf dem Wasserbade und öfterem Umrühren anhält. Das überschüssige Permanganat beseitigt man durch Zufügen von etwas Eisenvitriol und dampft die Flüssigkeit samt dem bei der Oxydation entstandenen Braunstein auf etwa 50 *cm*³ ein.

Die so vorbereitete Lösung bringt man jetzt mit dem Braunstein in einen kleinen, etwa 100 *cm*³ fassenden *Schacherl*schen Extraktionsapparat (Fig. 2) und zieht sie mit reinem, mit Wasser gewaschenem, alkoholfreiem Äther aus. (Um während der Extraktion ein Emporkriechen der Bernsteinsäure an den Gefäßwänden zu vermeiden, setzt man dem Äther in dem Extraktionskölbchen etwa 3 Tropfen Essigsäure zu.) Nach 14- bis 16stündiger Extraktion destilliert man den Äther ab, löst den Extraktions-

[1]) *R. Kunz*, Bestimmung der Bernsteinsäure im Wein, nebst Bemerkungen über die Bestimmung der Äpfelsäure im Wein. Zeitschr. f. d. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 6. S. 721 (1903).

rückstand in wenig heißem Wasser, filtriert nach dem Erkalten durch ein kleines angefeuchtetes Filter in eine Platinschale und dampft auf dem Wasserbade zur Trockne ein.

Die so erhaltene Bernsteinsäure wird in Wasser gelöst und mit $^1/_{10}$-Normalnatronlauge und Phenolphtalein genau titriert.

Da während der Extraktion Spuren von Schwefelsäure mit übergehen, andrerseits auch noch geringe Spuren von Essigsäure zwischen den Kristallen zurückgehalten werden, so ist es notwendig, die eigentliche Bestimmung der Bernsteinsäure als Silbersalz vorzunehmen.

Zu diesem Zweck versetzt man die austitrierte Bernsteinsäure mit 20 bis 25 cm^3 $^1/_{10}$-Normalsilberlösung, bringt alles in einen Meßkolben und füllt auf 100 cm^3 auf. Nach kräftigem Umschütteln wird abfiltriert und in 50 cm^3 Filtrat, wie bei der Chlorbestimmung nach *Volhard*, in salpetersaurer Lösung mit Eisenalaun und $^1/_{10}$-Normalrhodanammoniumlösung das überschüssige Silber bestimmt. Aus der Differenz der angewandten Kubikzentimeter $^1/_{10}$-Normalsilberlösung und der zum Rücktitrieren verbrauchten Rhodanlösung ergibt sich die Menge der in 100 cm^3 der ursprünglichen Flüssigkeit, z. B. Wein, enthaltenen Bernsteinsäure. 1 cm^3 $^1/_{10}$-Normalsilberlösung entspricht 0·0059 *g* Bernsteinsäure.

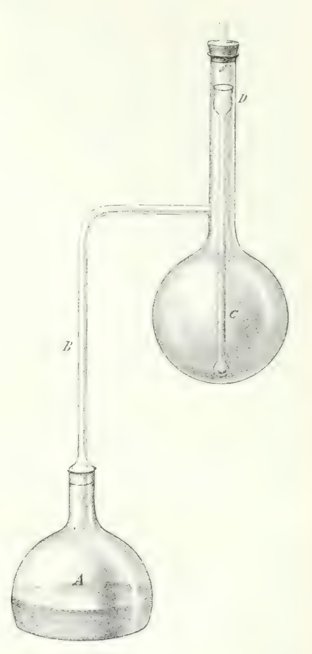


Fig. 2.

*Schacherl*scher Extraktionsapparat.

Bei einem Kontrollversuch wurde in Gegenwart anderer Säuren folgendes Resultat erhalten.

Es wurden angewandt:

Bernsteinsäure	Weinstein	Weinsäure	Äpfelsäure	Milchsäure
0·1329 *g*	0·25 *g*	0·10 *g*	0·20 *g*	0·50 *g*

Erhalten wurden an Bernsteinsäure:

a) Durch Titration: 0·1318 *g*; als Silbersalz 0·1284 *g*
Differenz — 0·0045 *g*.

b) „ „ : 0·1316 *g*; als Silbersalz 0·1287 *g*
Differenz — 0·0042 *g*.

Bei Prüfung wurde der Gehalt des Silbersalzes an Silber theoretisch genau befunden und auch der Schmelzpunkt der isolierten Bernsteinsäure kontrolliert.

Die Resultate der Titration liegen den theoretischen sehr nahe. Es scheint hier ein Fehlerausgleich stattgefunden zu haben. Aber auch die Befunde als Silbersalz weichen nur um etwa 3·5% von dem wahren Werte ab. Die Methode ist daher durchaus empfehlenswert!

Wirkungsweise des *Schacherl*schen Extraktionsapparates.

Die zu extrahierende Flüssigkeit kommt in den Kolben *C*, und zwar muß dieser bis zum Halse, nötigenfalls durch Wasserzusatz gefüllt werden. In den Kolben *A*, welcher in ein Wasserbad gestellt wird, kommt das Extraktionsmittel. Die Dämpfe des letzteren gehen durch das Rohr *B* und den Zwischenraum zwischen dem Trichter *D* und dem Kolbenhals zum Kühler, werden dort kondensiert und fließen in den Trichter *D* hinein. Sobald die Flüssigkeitssäule im Trichterrohr eine gewisse Höhe erreicht hat, tritt das Extraktionsmittel unten in kleinen Kügelchen aus, durchströmt die wässerige Lösung, entzieht derselben die in ihm löslichen Stoffe und sammelt sich oben an.

Sobald die Höhe des seitlich einmündenden Rohres *B* erreicht ist, fließt das Extraktionsmittel oben in dem Maße in das Kölbchen *A* ab, als neuer Äther durch das Trichterrohr unten austritt. Die Extraktion kann quantitativ ausgeführt werden, die Dauer derselben ist abhängig von dem Grade der Löslichkeit des zu extrahierenden Körpers.

Um die Korke zu vermeiden, empfiehlt es sich ganz besonders, Apparate zu verwenden, bei denen das Kölbchen *A* an das Rohr *B* angeschliffen ist.[1])

Da bei einer lange dauernden Extraktion das Lösungsmittel mit Hilfe eines gewöhnlichen Kühlers nur schwer zu kondensieren ist, setzt man auf den Extraktionsapparat am besten einen metallenen oder gläsernen *Soxhlet*schen Kugelkühler auf.

Milchsäure.

Eigenschaften. Unter den Oxypropionsäuren der Zusammensetzung $C_3 H_6 O_3$ hat nur die α-Säure, oder Äthylidenmilchsäure $CH_3 - CH(OH) - COOH$ physiologisches Interesse. Da diese Säure ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält, kann sie als inaktive, rechts- und linksdrehende Modifikation vorkommen. In der Tat finden sich alle drei Formen bei biologischen Prozessen: die inaktive Gärungsmilchsäure entsteht bei der großen Zahl der Kohlenhydratzersetzungen.[2]) Die rechtsdrehende Para- oder Fleischmilchsäure ist die eigentliche Milchsäure des Fleischextrakts; sie scheint auch die Milchsäure zahlreicher tierischer Organe, Transsudate und Exkrete zu sein. Die Linksmilchsäure wird von verschiedenen Bakterien aus Zucker gebildet und ist zuerst von *Schardinger*[3]) bei Vergärung von Rohrzucker durch den Bac. acidi laevolactici erhalten worden.

In vollkommen reinem Zustande ist die Milchsäure fest, kristallinisch und schmilzt bei 18°. Für gewöhnlich erhält man sie aber in amorphem

---

[1]) Erhältlich beim Glasbläser Paul Haack, Wien, IX/$_3$, Garelligasse 4 in verschiedenen Größen.

[2]) Vgl. *O. Emmerling*, Die Zersetzung stickstofffreier organischer Substanz durch Bakterien. Braunschweig 1902. S. 25.

[3]) *Fr. Schardinger*, Über eine neue optisch-aktive Modifikation der Milchsäure, durch bakterielle Spaltung des Rohrzuckers erhalten. Monatsh. f. Chem. Bd. **11**. S. 545 (1890).

Zustand in Form eines farblosen oder schwach gelblichen, sauer reagierenden Sirups, welcher in allen Verhältnissen mit Wasser, Alkohol und Äther mischbar ist. Die spezifische Drehung der aktiven Säure ist nur $= 3·5°$. Die zum Nachweis verwandten Zinksalze drehen umgekehrt wie die entsprechenden Säuren.

Nachweis der Milchsäuren. Dem Nachweis der Milchsäuren hat ihre Isolierung vorauszugehen, die vermittelst ihrer Löslichkeit in Äther zu erreichen ist. Handelt es sich um Gärprodukte, so kann man nach dem Entfernen der flüchtigen Säuren durch die Wasserdampfdestillation die mit Schwefelsäure angesäuerte Lösung gleich mit Äther extrahieren.

Der Nachweis der Milchsäure in Organen und Geweben geschieht jedoch erst nach Beseitigung der Eiweißstoffe und Fette. Nach vollständiger Extraktion mit Wasser entfernt man das Eiweiß durch Koagulation in der Siedehitze unter Zusatz einer kleinen Menge Schwefelsäure. Die Flüssigkeit wird darauf durch Ätzbaryt im Sieden genau neutralisiert und nach der Filtration zum Sirup eingedampft. Der Rückstand wird mit absolutem Alkohol gefällt und der Niederschlag mit Alkohol vollständig erschöpft. Aus den vereinigten alkoholischen Extrakten wird der Alkohol vollständig abdestilliert und der neutrale Rückstand zur Entfernung des Fettes mit Äther geschüttelt. Dann nimmt man den Rückstand mit Wasser auf, setzt Phosphorsäure zu und schüttelt wiederholt mit neuen Mengen Äther, welcher die Milchsäure aufnimmt. Aus den vereinigten Ätherextrakten wird der Äther abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst und diese Lösung auf dem Wasserbade, um den etwa zurückgebliebenen Äther und flüchtige Säuren zu entfernen, vorsichtig erwärmt. Aus der filtrierten Lösung wird dann durch Kochen mit Zinkkarbonat eine Lösung des Zinklaktates dargestellt, welche zu beginnender Kristallisation eingedampft und dann über Schwefelsäure stehen gelassen wird. Zum sicheren Nachweis ist eine Analyse des Salzes unbedingt notwendig.

Die freie Säure kann man vorher auf ihr Drehungsvermögen prüfen. Weiterhin entscheidet die Analyse, welche der Milchsäuren vorlag. Das inaktive Zinklaktat entspricht der Zusammensetzung $(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$ und enthält $27·27\%$ ZnO und $18·18\%$ H_2O. Die Zinksalze der aktiven Säuren sind nach der Formel $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2H_2O$ zusammengesetzt, enthalten also $29·0\%$ ZnO und $12·9\%$ H_2O. Das inaktive Zinklaktat löst sich bei 15° in 58—63 Teilen Wasser, das Zinksalz der Paramilchsäure braucht nur 17·5 Teile Wasser zur Lösung.

Bestimmung der Milchsäure in Abwesenheit anderer nicht flüchtiger Säuren.[1]

Dieses hier zu beschreibende Verfahren, welches auf der Extraktion der Milchsäure mit Äther beruht, kann nur in Abwesenheit anderer nicht

---

[1]) *Buchner* und *Meisenheimer*, Die chemischen Vorgänge bei der Hefegärung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 37. S. 495 (1904).

flüchtiger Säuren angewandt werden. Trotzdem die Methode kaum einfacher ist, als die in Anwesenheit solcher Säuren zu verwendende, bietet sie den Vorteil, daß man die Milchsäure in Gestalt ihres Zinksalzes isoliert und dann durch dessen Analyse zu größerer Verläßlichkeit als in dem zu zweit zu beschreibenden Verfahren kommt. Auch kann man durch die Drehungsbestimmung der Zinksalze ermitteln, ob Rechts- oder Linksmilchsäure vorlag, wenn das Salz auf zwei Moleküle Wasser stimmende Werte ergab.

Zur Bestimmung verfährt man wie folgt:

Zuerst befreit man die zu untersuchende Flüssigkeit mit Hilfe der Wasserdampfdestillation von den flüchtigen Säuren und dem Alkohol, dann filtriert man zur Entfernung eventuell ausgeschiedener Eiweißkörper durch ein Faltenfilter, wäscht mit heißem Wasser nach und engt das hellbraune Filtrat stark ein. Der hinterbleibende Sirup wird, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, in einen Scheidetrichter gespült und sechs- bis achtmal mit Äther ausgeschüttelt, so daß die letzten Auszüge keine Milchsäure mehr enthalten. Mit größerer Sicherheit kann man das vermittelst des vorher S. 28 beschriebenen *Schacherl*schen Extraktionsapparates erreichen. Die vereinigten Ätherauszüge, mit entwässertem Natriumsulfat oberflächlich getrocknet und durch ein Faltenfilter gegossen, hinterlassen beim Abdestillieren einen bräunlichen Rückstand. Die durch Kochen mit Bleikarbonat hergestellte und filtrierte Lösung des Bleisalzes wird durch Schwefelwasserstoff gefällt. Nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffes hinterbleibt eine klare, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit, welche, siedend heiß mit Zinkkarbonat versetzt, vom Überschuß des letzteren abfiltriert und auf dem Wasserbade stark eingeengt wird. Die Kristallisation des Zinksalzes befördert man durch Zusatz von Alkohol, wobei jedoch große Vorsicht nötig ist, da sonst Zinklaktat amorph ausfällt und außerdem andere Substanzen mitgerissen werden. Nach beendeter Ausscheidung wird das Salz abgesaugt und mit schwach verdünntem Alkohol ausgewaschen. Die Mutterlauge, nochmals in ähnlicher Weise behandelt, liefert nur in wenigen Fällen noch eine geringe Menge des Salzes, die mit der ersten Kristallisation vereinigt wird. Das so gewonnene und zu wägende Zinklaktat bildet ein weißes bis gelblichweißes Pulver oder Nadeln. Durch Trocknen des lufttrockenen Salzes bei 100° bestimmt man den Wasser-, durch Veraschen im Porzellantiegel den Zinkoxydgehalt.

Bestimmung der Milchsäure in Anwesenheit anderer nicht flüchtiger Säuren[1] (Weinsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, z. B. im Wein).

Die Trennung der Milchsäure von den genannten Säuren beruht auf der leichten Löslichkeit des Baryumlaktates in starkem Alkohol (70 bis 80 Volumprozente). Da aber beim Absättigen der zu untersuchenden Flüssig-

[1]) *Möslinger,* Über die Säuren des Weines und den Säurerückgang. Zeitschr. f. d. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 4. S. 1120 (1904).

keit, z. B. des Weines, mittelst Barytwasser nicht bloß die Baryumsalze, sondern bei Vorhandensein organisch saurer Alkalien (Weinstein, Kaliummalat usw.) auch die neutralen Alkalisalze eben dieser Säuren entstehen, so muß man entweder vor der Trennung der Barytsalze die vollständige Überführung der Säuren in die Barytsalze durch Umsetzung mit überschüssigem Chlorbaryum erzwingen (I.) oder die Mineralsalze entfernen (II.), welchem Wege bei Vorhandensein sehr geringer Mengen von Milchsäure oder bei Gegenwart größerer Mengen von Zucker der Vorzug zu geben ist.

I. Aus 50 oder 100 *cm*³ der zu untersuchenden Flüssigkeit (Wein) werden in bekannter Weise die flüchtigen Säuren mittelst Wasserdampf abdestilliert, und die zurückbleibende Flüssigkeit in einer Porzellanschale mit Barytwasser bis zur neutralen Reaktion gegen Lackmus abgesättigt. Nach dem Hinzufügen von 5—10 *cm*³ 10⁰/₀iger Chlorbaryumlösung wird bis auf etwa 25 *cm*³ eingedampft und mit einigen Tröpfchen Barytwasser aufs neue genaue Neutralisation hergestellt. Man fügt nun vorsichtig in geringen Mengen unter Umrühren reinsten 95⁰/₀igen Alkohol hinzu, bis die Flüssigkeit etwa 70—80 *cm*³ beträgt, und führt den Inhalt der Porzellanschale nunmehr unter Nachspülen mit Alkohol in einen 100 *cm*³-Kolben über, füllt mit Alkohol auf und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter, wobei der Trichter bedeckt gehalten wird. 80 *cm*³ oder mehr des Filtrates werden unter Zusatz von etwas Wasser in einer Platinschale verdampft, der Rückstand wird alsdann vorsichtig verkohlt und — ohne die Asche weiß zu brennen, was überflüssig ist — seine Alkalität mit ¹/₂-Normalsalzsäure in bekannter Weise bestimmt und in Kubikzentimeter Normalalkali ausgedrückt. 1 *cm*³ Aschenalkalität entspricht 0·090 *g* Milchsäure.

II. Nach dem Abtreiben der flüchtigen Säuren wird der Rückstand in einer Schale mit etwas Weinsäure versetzt, wozu meist 0·2 bzw. 0·4 *g* ausreichen, und bis zum dünnen Sirup (d. h. bis auf wenige Kubikzentimeter) eingedampft. Man gießt den Rückstand in einen mit Glasstopfen versehenen, 50 *cm*³ fassenden graduierten Stehzylinder, spült mit wenig Wasser, bis das Volumen der wässerigen Flüssigkeit etwa 5 *cm*³ beträgt, und darauf weiter mit kleinen Mengen von 95⁰/₀igem Alkohol nach, immer unter Umschütteln, bis die Flüssigkeit 30 *cm*³ beträgt; alsdann fügt man zweimal je 10 *cm*³ Äther hinzu, indem man jedesmal kräftig schüttelt. Das Gesamtvolumen beträgt nunmehr 50 *cm*³. Man schüttelt und läßt absitzen, bis die Flüssigkeit völlig klar geworden ist, gießt in eine Porzellanschale ab und spült mit Ätheralkohol nach. Unter Zusatz von Wasser wird die Flüssigkeit nunmehr zunächst vom Äther und Alkohol durch Eindampfen befreit, alsdann mit Barytwasser neutralisiert und — ohne Zusatz von Chlorbaryum — weiter wie unter I. verfahren.

Im allgemeinen findet man bei der Methode nur 90—95⁰/₀ der wirklich vorhandenen Milchsäure, wofür die Gründe im Original nachzulesen sind. Ein anderes, aber weit umständlicheres Verfahren[1]) gibt genauere Werte.

[1]) *R. Kunz,* Über Vorkommen und Bestimmung der Milchsäure im Weine. Zeitschr. f. d. Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel. Jg. 4. S. 673 (1904).

Weinsäure.

Die gewöhnliche, in den Pflanzen vorkommende Weinsäure von der Zusammensetzung $C_4 H_6 O_6$ ist die d-Weinsäure folgender Projektionsformel[1]):

$$\begin{array}{c} COOH \\ \cdot \\ H . C . OH \\ \cdot \\ HO . C . H \\ \cdot \\ COOH. \end{array}$$

Sie bildet durchsichtige, monokline hemimorphe Prismen von stark und rein saurem Geschmack und ist in Wasser ungemein leicht, auch in Alkohol leicht und in Äther fast unlöslich. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 170°.

Nachweis der Weinsäure.

Fügt man zu einer Lösung von freier Weinsäure oder zu einem Alkalisalz der Weinsäure Eisenchlorür oder schwefelsaures Eisenoxydul, dann ein oder zwei Tropfen Wasserstoffsuperoxyd und schließlich einen Überschuß von freiem Alkali, so tritt eine schön violette Färbung ein.[2]) Dies dient besonders zum Unterschiede von Zitronensäure. Die Reaktion ist geeignet zum Nachweis der Weinsäure, doch muß die zu prüfende Substanz frei von Schwermetallen und oxydierenden Substanzen sein.

Beim Erwärmen von Weinsäure oder Tartraten mit 1 cm^3 einer Lösung von 1 *g* Resorzin in 100 *g* Schwefelsäure (von 66° B) auf 125° entsteht eine violettrote Färbung, die noch $^1/_{10}$ *mg* Weinsäure nachzuweisen gestattet.[3]) Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure und Benzoesäure geben die Reaktion nicht. Gehemmt wird sie durch Nitrate oder Nitrite.

Zitronensäure.

Die Zitronensäure findet sich in großer Verbreitung im Pflanzenreich[4]), interessant ist ihre Bildung beim Wachstum verschiedener Pilze auf Zuckerlösungen.[5])

Die Zitronensäure von der Zusammensetzung $C_6 H_8 O_7$ und der Formel:

$$\begin{array}{c} CH_2 . COOH \\ \cdot \\ C(OH) . COOH \\ \cdot \\ CH_2 . COOH \end{array}$$

[1]) Vgl. *Czapek,* Biochemie der Pflanzen. Bd. 2. S. 432. Jena 1905/1907.

[2]) *Fenton,* Chemical News. Vol. 34. p. 110 (1882); Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 21. S. 123 (1881).

[3]) *Ed. Mohler,* Sur une réaction très sensible de l'acide tartrique. Bulletin de la soc. chimique de Paris. IIIe série. T. 4. p. 728 (1890).

[4]) Vgl. *Czapek,* l. c. Bd. 2. S. 436.

[5]) *C. Wehmer* in *Lafar,* l. c. Bd. 4. S. 246.

bildet große rhombische Prismen. Sie kristallisiert mit einem Molekül Kristallwasser und ist in Wasser sehr leicht, in Alkohol ziemlich leicht und in Äther sehr schwer löslich.

Nachweis der Zitronensäure.

Bei der Oxydation von Zitronensäure mit Kaliumpermanganat bildet sich Acetondikarbonsäure, welche mit Mercurisulfat einen charakteristischen Niederschlag folgender Zusammensetzung gibt:

$$SO_4\left\langle\begin{matrix}Hg - O \\ Hg - O\end{matrix}\right\rangle Hg \, . \, 2 \left[\begin{matrix}CH_2 - CO - O \\ | \\ CO \\ | \\ CH_2 - CO - O\end{matrix}\right\rangle Hg$$

Da Essigsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure etc. Glyzerin, Gummi, Glukose, Saccharose, Laktose die Reaktion nicht geben, und da sich mit ihrer Hilfe sehr geringe Mengen von Zitronensäure, im Wein z. B. 0·1 *g* per Liter nachweisen lassen, so ist diese Methode des Nachweises die empfehlenswerteste. Chloride, Bromide und Jodide müssen durch Silbernitrat oder Mercuroacetat entfernt werden. Die Oxalsäure, welche selbständig einen Niederschlag mit Mercurisalz gibt, wird am besten zuerst in saurer Lösung mit Permanganat zerstört.[1])

1) Nachweis von Zitronensäure oder deren Salzen in wässeriger Lösung: In ein Reagenzglas gibt man 5 cm^3 der zu prüfenden Lösung und 1 cm^3 des Quecksilberreagenz, welches durch Lösen von 50 *g* rotem Quecksilberoxyd in einer warmen Mischung von 200 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und 1000 cm^3 Wasser hergestellt wird. Man bringt zum Kochen und während man die Flamme entfernt, fügt man 5—6 Tropfen einer 2:1000 Permanganatlösung zu. Die Mischung entfärbt sich schnell, und im Falle der Anwesenheit von Zitronensäure, im freien oder gebundenen Zustande, bildet sich sogleich eine Trübung oder ein Niederschlag. Bei sehr verdünnten Lösungen genügt ein Tropfen Permanganat; so kann man weniger als $^1/_2$ *mg* Zitronensäure nachweisen. Bei größerer Verdünnung fügt man nur den zehnten Teil ihres Volumens an Quecksilberreagenz zu und man bedient sich einer Permanganatlösung von 2 oder 3 *g* pro Liter, wie der $^1/_{10}$-Normallösung.

2) In Gegenwart größerer Mengen von Weinsäure fügt man zu 5 cm^3 der kalten Lösung schnell 1 cm^3 der Permanganatlösung (2 : 100) und erwärmt, bis die Mischung bräunliche Farbe annimmt und einige Gasblasen entweichen; jetzt nimmt man die Flamme fort und wartet, bis die Flüssigkeit ganz entfärbt ist, was bald eintritt. Dann fügt man 1 cm^3 Quecksilberreagenz hinzu und erhitzt bis zum Kochen. Man erhält so eine weiße Trübung bei 0·5 oder weniger Prozent Zitronensäure.

[1]) *G. Denigès*, Sur de nouvelles classes de combinaisons mercurico organiques et sur leurs applications. Annales de chimie et de physique. (VII.) T. 18. p. 382 (1899).

Auf die geschilderte Weise kann man die Zitronensäure im Wein und in der Milch nachweisen. Der Wein wird erst mit Bleisuperoxyd gekocht und nachher Permanganat zugegeben. Die Milch ($10\ cm^3$) wird zuerst mit $2\ cm^3$ einer Lösung von Natriummetaphosphat (5:100) gekocht und erst nach dem Filtrieren wie vorher Permanganat zugesetzt. In beiden Fällen wurde das Quecksilberreagenz gleich zuerst hinzugefügt.

Äpfelsäure.

Die Äpfelsäure findet sich in kryptogamen und phanerogamen Pflanzen.[1]) Ihrer Zusammensetzung $C_4H_6O_5$ entspricht die Formel

$$\begin{array}{l} COOH \\ \cdot \\ CH_2 \\ \cdot \\ CH(OH) \\ \cdot \\ COOH, \end{array}$$

die sie als Oxybernsteinsäure charakterisiert. Sie bildet glänzende, gewöhnlich zu kugeligen Massen vereinigte, zerfließliche Nadeln, die in Wasser und Alkohol leicht, in Äther wenig löslich sind. Sie schmilzt bei 100°.

Nachweis und Bestimmung der Äpfelsäure.[2])

Im Gegensatz zu Weinsäure, Bernsteinsäure und Essigsäure reduziert die Äpfelsäure in schwach alkalischer oder neutraler Lösung in der Siedehitze das Palladiumchlorid. Auf Grund dieser Eigenschaft wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Äpfelsäure ausgearbeitet, die hier angegeben sei. Da wir keine geeignetere Methode zum Nachweis dieser Säure kennen, verwenden wir ihr Verhalten gegen Palladiumchlorid auch hierzu.

Das Reduktionsvermögen der Äpfelsäure gegenüber Palladiumchlorid hat sich folgendermaßen herausgestellt:

1 *g* Äpfelsäure reduziert aus Palladiumchlorid 0·294 *g* Palladium. Von den Weinbestandteilen wirken ebenfalls mehr oder weniger reduzierend die flüchtigen Bestandteile, Glyzerin, Glykolsäure, Gerbstoff, ferner Farbstoff und Zucker.

Folgende Methode hat sich auf Grund zahlreicher Versuche für die quantitative Bestimmung der Äpfelsäure im Weine bewährt:

„$100\ cm^3$ Wein werden im Wasserbade zur Beseitigung der flüchtigen Bestandteile bis auf ein Dritteil eingedampft und hierauf mit basischem Bleiacetat bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Der erhaltene Niederschlag, der die Äpfelsäure vollkommen einschließt, wird abfiltriert, vier- bis fünfmal mit kaltem Wasser ausgewaschen und hierauf

[1]) Vgl. *Czapek*, l. c. Bd. 2. S. 428.

[2]) *A. Hilger* und *H. Ley*, Über die quantitative Bestimmung der Äpfelsäure. Zeitschr. f. d. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. Bd. 2. S. 795 (1899). — *A. Hilger*, Zur quantitativen Bestimmung der Äpfelsäure. Ibid. Bd. 4. S. 49 (1901).

in wenig siedender verdünnter Essigsäure oder Salpetersäure gelöst. Diese Lösung wird in der Siedehitze mit Natriumkarbonat bis zur alkalischen Reaktion versetzt und gleichzeitig während des Erhitzens etwa 10 Minuten ein Strom Kohlensäure eingeleitet. Nach Trennung des basischen Bleikarbonates durch Filtration wird das Filtrat bis auf mindestens 100 *cm*³ konzentriert, wieder mit Salzsäure neutralisiert, hierauf in einem 500 *cm*³ fassenden Erlenmeyerkolben mit 10 *cm*³ einer 5⁰/₀igen Palladiumchloridlösung vermischt und hierauf 10 Minuten im Sieden erhalten. Unter lebhafter Kohlensäureentwicklung erfolgt die Reduktion des Palladiumchlorids. Hat die Kohlensäureentwicklung aufgehört, so wird mittels Salzsäure wieder schwach sauer gemacht und das Erhitzen auf dem Wasserbade fortgesetzt, bis sich das Palladium zusammenballt und zu Boden setzt. Das ausgeschiedene, nun sehr gut filtrierbare Metall wird durch ein *Allihn*sches Rohr filtriert, vollkommen ausgewaschen, getrocknet, im Kohlensäurestrom erhitzt und nach dem Erkalten zur Wägung gebracht. Ich bemerke noch, daß die Zerlegung der Bleifällung auch durch Schwefelwasserstoff erfolgen kann, wodurch jedoch eine Verzögerung eintritt, da das vollkommene Verdampfen der gewonnenen Lösung notwendig wird.

Bei Rotweinen hat sich ferner auch die Entfärbung mittelst Tierkohle vor der Konzentration des Weines bewährt, ebenso möge darauf hingewiesen werden, daß auch die Bestimmung der flüchtigen Säuren mit der Äpfelsäurebestimmung verbunden werden kann, indem nach Beseitigung der flüchtigen Säuren durch Destillation mittelst eines Wasserdampfstromes der Destillationsrückstand für die Äpfelsäurebestimmung geeignet ist."

Um vom Glyzerin zu trennen, welches sich ja im Wein auch findet und das Palladiumchlorid ebenfalls reduziert, werden die vorhandenen Säuren mit Bleiacetat gefällt und aus dem Niederschlag mit Schwefelwasserstoff oder Kohlensäure wieder frei gemacht.

Bestimmung der Weinsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure nebeneinander.

Die Bestimmung und Trennung dieser Säuren ist noch wenig ausgearbeitet. Die früher für die Bestimmung der Zitronensäure angewandten Verfahren haben sich als falsch erwiesen.[1] Am besten wird man noch nach folgenden Angaben verfahren[2]:

Verfahren zur Trennung, Bestimmung und Identifizierung der Weinsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure in Weinen, Fruchtsäften u. dgl.

Der Gang des Verfahrens, das nach vielen Versuchen in sehr verschiedenen Richtungen zurzeit verwendet wird, ist der folgende:

[1] *O. v. Spindler,* Zitronensäurebestimmung mittelst der Kalkmethode. Chem.-Ztg. Bd. **27**. S. 1263 (1903).

[2] *Jörgensen,* Über die Bestimmung einiger in den Pflanzen vorkommender organischer Säuren. Zeitschr. f. d. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. Bd. **13**. S. 241 (1907).

Die Lösung wird neutralisiert, mit Bleiacetat und Alkohol versetzt, der ausgewaschene Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid wird eingeengt, mit Kaliumhydroxyd neutralisiert und mit Alkohol gefällt, wodurch die Gerbsäure zum Teil und bei Gegenwart größerer Mengen von Schwefelsäure und Phosphorsäure auch etwas von diesen Säuren gefällt wird. Aus dem weingeistigen Filtrat wird die Weinsäure mittelst Eisessigs als saures Kaliumtartrat gefällt, worauf die Bernsteinsäure aus dem entgeisteten, mit Salzsäure versetzten Filtrat mittelst Äthers ausgeschüttelt wird. Die Mengen dieser Säuren werden durch Titration ermittelt. Die rückständige wässerige Lösung wird neutralisiert und mit Baryumchlorid versetzt, wodurch die Schwefelsäure, Phosphorsäure und etwas Gerbsäure gefällt werden. Aus diesem Filtrat schlägt sich beim Versetzen mit einer geringeren Menge Alkohol das Baryumzitrat nieder und die zurückbleibende Äpfeläure wird mittelst einer größeren Menge Alkohol gefällt. Eine weitergehende Trennung und Reinigung dieser Säuren ist jedoch oft erforderlich. Aus den in den Baryumsalzen vorhandenen Baryummengen werden die Mengen dieser Säuren berechnet.

Als Reagenzlösungen verwendet man eine 20%ige Bleiacetatlösung, eine 10%ige Baryumchloridlösung und eine 4%ige Schwefelsäure. Der Alkohol hat eine Stärke von 90—91 Volumprozent; überall kommen möglichst kleine Filter zur Verwendung.

Von Weinen verwendet man 100 cm^3, von den Frucht- und Obstsäften, wie Himbeer-, Holunderbeer-, Heidelbeer- und Kirschsaft, 25 cm^3 und von den süßen Sirupen 50 cm^3.

Diese Lösung wird, wenn sie stark zuckerhaltig ist, verdünnt und mit Natronlauge nahezu neutralisiert, mit einem Überschuß von Bleiacetat gefällt — von der 20%igen Bleiacetatlösung reichen in der Regel 10 bis 20 cm^3 aus — und nach dem Umschütteln mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Am nächsten Tage wird der Niederschlag durch ein Filter von passender Größe filtriert und nach dem Abtröpfeln bringt man den größten Teil des Niederschlages mittelst eines Glasspatels in die Fällungsflasche zurück, wo er mit Wasser aufgeschüttelt und darauf mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt wird. Durch mehrfaches Dekantieren und Filtrieren wird der Niederschlag ausgewaschen, bis das Filtrat beinahe farblos ist und nur geringe Mengen von Blei und Zucker oder anderen organischen Stoffen enthält. Drei bis vier Auswaschungen sind für gewöhnlich hinreichend, und um ein Zusammenballen des Niederschlages möglichst zu verhindern, muß der Trichter mit einer Glasplatte bedeckt werden, besonders wenn etwa der Niederschlag auf dem Filter während der Nacht stehen bleibt. Nach beendigtem Auswaschen bringt man den Niederschlag mit Wasser in die Flasche zurück, erhitzt zum Kochen und leitet einen Schwefelwasserstoffstrom bis zur Erkaltung hindurch, wobei die Flüssigkeit wiederholt geschüttelt wird. Zur Vervollständigung der Zersetzung der Bleisalze wird noch einmal zum Kochen erhitzt und in gleicher Weise mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach dieser Behandlung sind die

Säuren fast immer völlig in Freiheit gesetzt, worauf das Bleisulfid abfiltriert und mit Schwefelwasserstoffwasser ausgewaschen wird. Die Lösung wird auf dem Wasserbade auf 30—40 *cm*³ eingeengt, dann unter Verwendung von Lackmuspapier mit Kalilauge neutralisiert oder schwach alkalisch gemacht und weiter bis auf etwa 10 *cm*³ verdampft. Wünscht man die Menge der Säuren zu kennen, so wird diese mit Kalilauge titriert. Die Flüssigkeit bringt man, ohne zu filtrieren, in einen Meßzylinder, die Schale wird mit Wasser nachgespült, bis das Volumen 15—20 *cm*³ beträgt, und nach dem Versetzen mit dem doppelten Volumen Alkohol und kräftigem Durchschütteln wird über Nacht beiseite gestellt. In der Regel ist diese Flüssigkeitsmenge zur Lösung des Kaliumtartrats und Kaliumzitrats hinreichend, so daß man nur den Niederschlag nach dem Filtrieren mit kleinen Mengen eines Gemisches von 2 Teilen Alkohol und 1 Teil Wasser zu waschen braucht, wenn nicht, so laugt man den Rückstand mit heißem Wasser aus und fällt noch einmal mit dem doppelten Volumen Alkohol.

1. Bestimmung der Weinsäure.

Das Filtrat samt der Waschflüssigkeit, im ganzen etwa 100 *cm*³, wird mit 3 *cm*³ Eisessig versetzt und während 48stündigen Stehens dann und wann geschüttelt. Hierdurch scheidet sich die etwa vorhandene Weinsäure in Form von schwach gefärbten Kristallen des sauren Kaliumtartrats aus, die nach dem Abfiltrieren mit kleinen Mengen der obengenannten Alkoholmischung bis zur neutralen Reaktion gewaschen werden. Das Filter samt den Kristallen wird in die Fällungsflasche zurückgebracht und unter Verwendung von Phenolphtalein als Indikator heiß mit $^1/_{10}$-Normalnatronlauge titriert, von welcher jeder Kubikzentimeter 0·015 *g* Weinsäure entspricht.

Zur Identifizierung der Weinsäure versetzt man die titrierte Flüssigkeit mit etwas Calciumchlorid und filtriert sogleich. Nach dem Stehen kristallisiert das Calciumtartrat aus, welches sich als solches durch sein charakteristisches Verhalten gegen Natron erkennen läßt. Es ist in Wasser unlöslich, in kalter Natronlauge löslich und wird aus der Lösung beim Erhitzen als Gallerte abgeschieden, löst sich aber wieder beim Erkalten.

2. Bestimmung der Bernsteinsäure.

Zur Bestimmung dieser Säure verwendet man besser die vorher angegebene genauere Methode. Um hier die Bernsteinsäure zu entfernen, extrahiert man mit Äther.

3. Bestimmung der Zitronensäure und der Äpfelsäure.

Die von den Ätherausschüttelungen zurückbleibende saure wässerige Lösung wird mit Natronlauge neutralisiert oder schwach übersättigt. Meistens muß man hierbei Lackmuspapier als Indikator verwenden; nur in selteneren Fällen ist die Lösung so wenig gefärbt, daß der Übergang mittelst Phenolphtaleins sichtbar ist. Die Lösung, die man im Meßzylinder bis auf

40 cm^3 ergänzt, fällt man mit Baryumchloridlösung, wozu in der Regel 10 cm^3 der 10%igen Lösung ausreichen. Ist der Niederschlag nach dem Stehen groß und voluminös, so kann er Baryumzitrat enthalten, und in diesem Falle spült man das Ganze in einen größeren Meßkolben, versetzt mit mehr Baryumchlorid, füllt bis zur Marke auf und arbeitet nur mit einem Teil des Filtrates (z. B. 72 cm^3, siehe unten). Setzt sich dagegen der Niederschlag ziemlich dicht ab, so besteht er aus den Baryumsalzen der Schwefelsäure, Phosphorsäure und der färbenden Gerbsäuren. Man filtriert die Lösung klar in einen 100 cm^3 fassenden Meßzylinder ab und spült das Filter mit Wasser aus, bis das Filtrat 72 cm^3 beträgt. Diese 72 cm^3 werden mit Weingeist bis zu 100 cm^3 versetzt, das Ganze gut durchschüttelt und beiseite gestellt.

Der Alkoholgehalt der durch Versetzen von fünf Raumteilen Wasser mit Alkohol bis zu sieben Raumteilen erhaltenen Flüssigkeit beträgt etwa 28 Volumprozent.

Die Trennung der Zitronensäure von der Äpfelsäure gründet sich auf folgende Verhältnisse:

1. Das Baryumzitrat ist in 28 volumprozentigem Alkohol sehr wenig löslich, jedoch ist es bei großen Flüssigkeitsmengen erforderlich, auf eine geringe Löslichkeit Rücksicht zu nehmen.

2. Das Baryummalat ist in 28 volumprozentigen Alkohol weit löslicher, jedoch sind 100 cm^3 der Flüssigkeit nicht immer zum Lösen des vorhandenen Baryummalates hinreichend.

3. Wenn der Niederschlag von Baryumzitrat groß ist, wird Baryummalat leicht mitgefällt; es ist daher notwendig, den Niederschlag in Wasser zu lösen und ihn nochmals mit Alkohol zu fällen.

4. Das Baryummalat ist in einem neutralen Gemisch von 1 Teil Wasser und 2 Teilen Alkohol praktisch unlöslich, während eine 10%ige Baryumchloridlösung von dem doppelten Volumen Alkohol nicht gefällt wird.

Das weitere Verfahren muß sich deshalb nach dem Mengenverhältnis dieser beiden Säuren richten; es können die folgenden vier Fälle vorliegen:

1. Beträchtliche Mengen der beiden Säuren.
2. Geringe Mengen der beiden Säuren.
3. Verhältnismäßig viel Zitronensäure und wenig oder keine Äpfelsäure.
4. Verhältnismäßig viel Äpfelsäure und wenig oder keine Zitronensäure.

Erster Fall. Wie oben angegeben ist, liegen 100 cm^3 einer 28 Volumprozente Alkohol enthaltenden neutralen Flüssigkeit mit Niederschlag vor. Dieser wird nach mindestens einstündigem Stehen abfiltriert. Nach dem Abtropfen bringt man den Trichter auf den Meßzylinder zurück und löst den Niederschlag durch Aufspritzen von Wasser nötigenfalls unter Um-

rühren mit einem kleinen Glasspatel auf, so daß das Flüssigkeitsvolumen wieder 72 cm^3 beträgt, die noch einmal mit 28 cm^3 Alkohol gefällt werden. Die Filtrate werden jedes für sich bis auf etwa 5 cm^3 verdampft, wenn nötig filtriert, in einen Meßzylinder gebracht und mit Wasser bis auf etwa 17 cm^3 gewaschen, wonach mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt wird. Solange die Filtrate beträchtliche Mengen von Baryummalat enthalten, hat man das Baryumzitrat in derselben Weise zu reinigen. Eine zweimalige Fällung des Baryumzitrates dürfte aber wohl immer ausreichen.

Zweiter Fall. Liegen geringe Mengen der beiden Säuren vor, so ist eine geringere Menge Baryumchlorid hinreichend, und die Trennung mittelst 28volumprozentigen Alkohols wird in einem geringeren Flüssigkeitsvolumen vorgenommen, z. B. sind 25 cm^3 der wässerigen Lösung mit 10 cm^3 Alkohol zu fällen und eine Wiederlösung des Baryumzitrates wird überflüssig sein; man kann die Reinigung durch Auswaschen mit 28 volumprozentigem Alkohol bewerkstelligen; alsdann wird das baryummalathaltige Filtrat eingeengt und mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt.

Dritter Fall. Bei verhältnismäßig geringen Mengen Äpfelsäure wird der Baryumzitratniederschlag noch zweimal in Wasser gelöst und gefällt, und die drei Filtrate, die somit 300 cm^3 betragen, werden zugleich verdampft und z. B. auf 25 cm^3 gebracht und alsdann mit 10 cm^3 Alkohol gefällt. Wenn die Lösung möglichst neutral ist, kann man die Löslichkeit des Baryumzitrates vernachlässigen und das im Filtrat vorhandene Baryummalat ausfällen.

Vierter Fall. Ist die Äpfelsäuremenge nicht zu groß, so besteht der erste Niederschlag, der somit gering ist, aus Baryumzitrat, und es genügt, ihn mit kleinen Mengen 28volumprozentigen Alkohols auszuwaschen. Bei größeren Mengen Äpfelsäure fällt ein Teil mit der Zitronensäure aus und es ist daher notwendig, die Fällung nochmals zu lösen und abermals, nötigenfalls auch noch ein drittes Mal, zu fällen. Hierdurch löst sich ein wenig des Baryumzitrates, und wäre der Zitronensäuregehalt so gering, daß alles Baryumzitrat in Lösung ginge, so ließe sich die Zitronensäure in dieser Weise nicht nachweisen.

Mag man das eine oder das andere Verfahren zur Trennung der Zitronensäure von der Äpfelsäure benutzt haben, in allen Fällen verfährt man bei der Mengenbestimmung der Säuren in folgender Weise:

Liegen mehrere Niederschläge von den Baryumsalzen vor, und ist es ohne Interesse, die Menge jedes einzelnen zu kennen, so werden sie zusammen behandelt; im anderen Falle muß man jeden für sich behandeln. Das ausgeschiedene Baryummalat wird nach dem Stehen über Nacht mit einem Gemische von einem Teil Wasser und zwei Teilen Alkohol gewaschen, wonach die Niederschläge in schwach salpeteräurehaltigem Wasser gelöst und kochend heiß mit einem kleinen Überschuß von verdünnter Schwefelsäure gefällt werden. Nach hinreichendem Stehen in der Wärme, bis das Baryumsulfat grobkörnig geworden ist, und darauffolgender Abkühlung wird der Niederschlag abfiltriert, geglüht und gewogen.

1 *g* Baryumsulfat entspricht 0·548 *g* Zitronensäure (wasserfrei),
1 *g* „ „ 0·574 *g* Äpfelsäure.

Beim Arbeiten mit stark gefärbten Weinen oder Säften fallen die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse zu hoch aus, weil die Niederschläge von Baryumzitrat und Baryummalat geringe Mengen der Baryumsalze der färbenden Gerbsäuren enthalten, was sich aus der Färbung der Filtrate vom Baryumsulfat ergibt. Es ist somit erforderlich, die vom Baryumsulfat — das man in diesem Falle nicht zu wägen braucht — erhaltenen Filtrate, die die freien Säuren enthalten, einer ferneren Reinigung zu unterwerfen, und diese kann man durch Neutralisieren mit Natronlauge und Fällen mit einem passenden Überschuß von Baryumchlorid bewerkstelligen, wonach die beinahe farblosen Filtrate, nötigenfalls nach dem Einengen, wie oben angegeben, mit Alkohol gefällt werden, und die Mengen der so gut wie ungefärbten Niederschläge nach dem Auswaschen als Baryumsulfat bestimmt werden.

Ist diese Reinigung notwendig, so ist es zweckmäßig, die zur Fällung benutzte Schwefelsäuremenge zu kennen, damit man einen passenden Überschuß an Baryumchlorid im Filtrat erhält; man verwendet deshalb eine abgemessene Menge einer 4%igen Schwefelsäure, die eben zur Fällung des gleichen Volumens der 10%igen Baryumchloridlösung ausreicht.

Die Filtrate von dem zur Wägung kommenden Baryumsulfat können zur Identifizierung der Säuren dienen.

Oxalsäure.

Die Oxalsäure kommt in Pflanzen häufig als Calciumoxalat in Kristallen vor[1]); sie wird von Bakterien[2]) und Schimmelpilzen gebildet[3]); auch im Harn findet sie sich als physiologischer Bestandteil, während sie in den Geweben nur in einzelnen Fällen gesucht wurde.[4])

Die Oxalsäure von der Zusammensetzung $C_2H_2O_4$ und der Formel

$$\begin{array}{c} COOH \\ | \\ COOH \end{array}$$

kristallisiert in monoklinen Säulen mit einem Molekül Kristallwasser; ein Teil kristallisierter Säure löst sich bei 14·5° in 10·5 Teilen Wasser. Auch in Alkohol und Äther ist sie, wenn auch in geringerem Grade, löslich.

Nachweis der Oxalsäure.

Die Unlöslichkeit des oxalsauren Kalkes in Essigsäure, die Löslichkeit dieses Salzes in verdünnten Mineralsäuren, die Ausscheidung von Gipsnadeln nach Auflösen des Calciumoxalates in Schwefelsäure und dessen

[1]) Vgl. zahlreiche Angaben bei *Czapek*, Biochemie der Pflanzen. Jena 1905/07.
[2]) Vgl. *Czapek*, l. c. Bd. 2. S. 422.
[3]) Vgl. *Czapek*, l. c. Bd. 4. S. 423. Besonders *C. Wehmer* in *Lafar*, l. c. Bd. 4. S. 243.
[4]) Vgl. *Hammarsten*, Lehrbuch der physiologischen Chemie. S. 504.

Übergang in Calciumoxyd beim Glühen sind für Oxalsäure charakteristisch. Da aber auch andere organische Säuren (Äpfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure) diese Reaktionen geben, ist zum unbedingten Nachweis die Extraktion mit Äther vorzuziehen.

Zum Nachweis der Oxalsäure setzt man dem Äther etwas Alkohol zu, in dem die Oxalsäure leichter löslich ist und der besseres Absetzen veranlaßt.

Der Harn wird nach dem Verdampfen auf kleines Volumen und Ansäuern mit Salzsäure direkt mit Äther extrahiert. Die Gewebe werden mit dem mehrfachen Volumen Wasser digeriert, dann direkt zum Sieden erhitzt, koliert, abgepreßt, nachgewaschen, eingedampft, eventuell noch einmal filtriert und der stark eingeengte Auszug nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit Äther ausgeschüttelt. Dann verfährt man wie bei der Bestimmung der Oxalsäure.

Bestimmung der Oxalsäure bei Pilzgärungen. Hier kann man, da es sich um geringe Mengen von Oxalsäure handelt und andere nicht flüchtige Säuren in bedeutendem Maße kaum gebildet werden, so verfahren, daß man die mit Salzsäure angesäuerte Lösung zuerst zur Vertreibung eventueller flüchtiger Säuren auf dem Wasserbad eindampft, dann filtriert und das heiße Filtrat mit Ammoniak und Calciumchlorid versetzt. Der Niederschlag, welcher sich nach 24 Stunden absetzt, wird auf einem Filter gesammelt und von dem Filter mit Hilfe der Spritzflasche in 100 cm^3 auf 60° erwärmte verdünnte Schwefelsäure gespült und sofort mit $^1/_{10}$-Normalpermanganat titriert. Die Entfärbung des Permanganates fängt für gewöhnlich erst nach ein paar Minuten an, schreitet dann aber bis zum Verbrauche der Oxalsäure fort. 1 cm^3 $^1/_{10}$-Normalpermanganat entsprechen 45·01 *mg* Oxalsäure.

Die Genauigkeit der Methode wird etwas dadurch beeinträchtigt, daß auch andere Säuren, die durch Chlorcalcium in ammoniakalischer Lösung ausgefällt werden, Permanganat in der Wärme, wenn auch in weit geringerem Maße als Oxalsäure reduzieren. Immerhin ist diese Methode für die Bestimmung der Oxalsäure bei manchen biologischen Prozessen der nächst zu beschreibenden vorzuziehen.

Bestimmung der Oxalsäure im Harn und in den Geweben.[1]) Der Harn oder ein, wie vorher angegeben, hergestellter Gewebeauszug wird eingedampft (500 cm^3 Harn auf etwa $^1/_3$ seines Volumens). Man säuert mit 20 cm^3 Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1·12 an und schüttelt dreimal mit 200 cm^3 eines Gemisches von 9 bis 10 Volumen Äther und 1 Volumen Alkohol (mit Vorteil kann man sich hierzu auch des vorher Seite 28 beschriebenen Ätherextraktionsapparates bedienen). Die Ätherauszüge werden sorgfältig abgetrennt, dann noch durch ein nicht angefeuchtetes Filter filtriert und abdestilliert. Die zurückbleibende, noch etwas Äther enthal-

---

[1]) *E. Salkowski*, Über die Bestimmung der Oxalsäure und das Vorkommen von Oxalsäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 437 (1904). — Vgl. auch *Hugh Mac Lean:* Über die quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Harn. Ebenda. Bd. **60**. S. 20 (1909).

tende Flüssigkeit wird in eine hochwandige Schale gegossen und unter Zusatz von etwa 10 bis 15 cm^3 Wasser auf dem Wasserbade eingeengt, die entstehende milchige Flüssigkeit weiter eingedampft, nötigenfalls unter Wasserzusatz, bis sie sich klärt und sich harzige Massen ausscheiden. Man läßt nun erkalten, wobei völlige Klärung der Flüssigkeit eintritt — das Volumen der Flüssigkeit sei etwa 20 cm^3, eventuell ist etwas Wasser hinzuzusetzen —, filtriert durch ein kleines Filterchen und wäscht ein- bis zweimal mit möglichst wenig Wasser nach. Das Filtrat wird mit Ammoniak leicht alkalisch gemacht, 1 bis 2 cm^3 einer 10%igen Calciumchloridlösung, dann Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion zugesetzt. Die Reaktion soll sauer, aber nicht zu stark sauer sein. Einen Anhaltspunkt gewährt die Beschaffenheit der Flüssigkeit nach dem Essigsäurezusatz. Da sie stets etwas Phosphorsäure enthält, so entsteht beim Zusatz von Calciumchlorid eine flockige Ausscheidung von Calciumphosphat; man muß soviel Essigsäure hinzusetzen, daß diese sich löst.

Nach mindestens 24 Stunden wird der oxalsaure Kalk in der gewöhnlichen Weise auf einem aschefreien Filter gesammelt, ausgewaschen, getrocknet, geglüht und der zurückbleibende Ätzkalk gewogen (auch hier kann man, wie vorher angegeben, mit Permanganat titrieren).

Betreffend einige bei der Ausführung der Methode auftretender Komplikationen vergleiche das Original.

Kohlehydrate.

A. Darstellung und Gewinnung der hauptsächlichsten Zuckerarten des Tier- und Pflanzenreichs.

Von **B. Tollens**, Göttingen.

Vorbemerkung.

In dieser Übersicht werden die Darstellungsmethoden und die qualitativen und quantitativen Bestimmungsmethoden der meistens in Betracht kommenden Zuckerarten möglichst in Rücksicht auf die vorkommenden praktischen Bedürfnisse des Pflanzen- und Tierstoffe bearbeitenden Chemikers, Physiologen und Mediziners gebracht. Seltenere oder nur durch Synthese in wissenschaftlichen chemischen Laboratorien hervorzubringende Zuckerarten von einstweilen nur theoretischem Interesse, und so besonders auch die hochwichtigen synthetischen Methoden *E. Fischers* werden hier nicht betrachtet, und auch die übrigen Methoden sind mehr als Beispiele aus dem überreichlichen Materiale anzusehen, mit deren Benutzung auch die nicht in diese Übersicht aufgenommenen Zuckerarten in analoger Weise dargestellt und untersucht werden können.

Die zitierten Abhandlungen sind von mir aus den vielen vorhandenen nach dem Gesichtspunkte ausgewählt, daß möglichst diejenigen gebracht werden, welche — sei es als die ersten bahnbrechenden, sei es als die zu praktischen Zwecken brauchbarsten — mir als die wichtigsten erscheinen.

Vollständigkeit ist also weder in Hinsicht auf das vorhandene Material noch in Hinsicht der Zitate angestrebt worden, und ich verweise in dieser Beziehung auf die vorhandenen Lehr- und Handbücher, z. B. von *E. v. Lippmann*[1]), *B. Tollens*[2]), *L. Maquenne*[3]), *Frühling*[4]), *J. König*[5]) usw., ferner

---

[1]) *E. v. Lippmann*, Chemie der Zuckerarten. 3. Aufl. Braunschweig. Vieweg. 1904.

[2]) *B. Tollens*, Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate. I. und II. Breslau. Trewendt. 1895. 1898. S. a. *Ladenburg*, Handwörterbuch der Chemie. Bd. 6 und 13.

[3]) *L. Maquenne*, Les sucres. Paris. Carré & Naud. 1900.

[4]) Anleitung zur Untersuchung der für die Zuckerindustrie in Betracht kommenden Rohmaterialien, Produkte, Nebenprodukte und Hilfssubstanzen. 6. Aufl. Von Prof. Dr. *R. Frühling*. Braunschweig 1903.

[5]) *J. König*, Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. 3. Aufl. Berlin. Parey. 1906.

in Hinsicht auf das theoretische auch auf *C. Neuberg* im Handbuch der Biochemie. Jena 1908. S. 159.

I. Kristallisation ohne vorherige Reinigung der aus den Ausgangsmaterialien gewonnenen Lösungen.

Um Zuckerarten, welche in den pflanzlichen oder tierischen Materialien in größerer Menge vorhanden sind, in reinem und, wenn möglich, kristallisiertem Zustande zu gewinnen, muß man zuerst die Säfte oder Lösungen, welche die Zuckerarten enthalten, aus den vegetabilischen oder animalischen Stoffen isolieren. Es werden hierzu die Stoffe zerkleinert, sei es mittelst

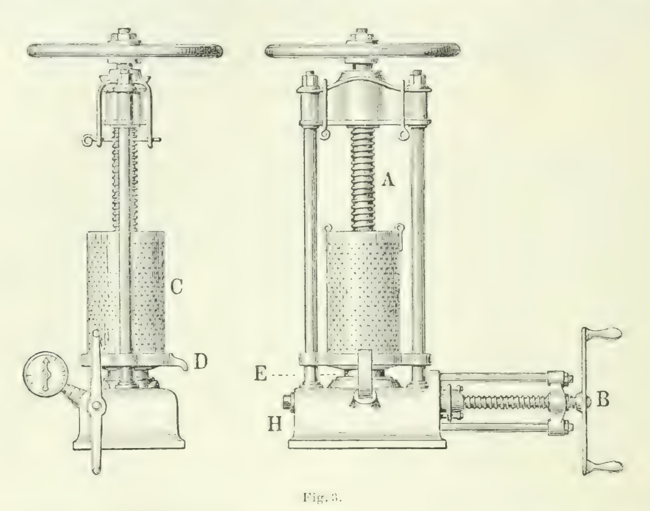


Fig. 3.

des Messers, eines Reibeisens oder der Fleischhackmaschine, der Häckselschneidemaschine usw., und dann gepreßt.

Als Pressen kommen entweder für geringen Druck Fruchtpressen des Haushalts oder für stärkeren Druck hydraulische Pressen oder Schraubenpressen in Anwendung, z. B. die obige (Fig. 3), welche besonders in Zuckerlaboratorien und -fabriken gebraucht wird (s. *Frühling*, Anleitung, S. 217). Zuerst drückt man mit der Schraubenspindel *A* den Preßstempel nach unten und nachher bewegt man mittelst der Schraubenspindel *B* den Stempel *E* der hydraulischen Presse nach oben, wobei das Manometer den ausgeübten Druck (bis 300 Atmosphären) anzeigt.

Ich arbeite seit langer Zeit mit einer von Samain & Co. in Blois herrührenden, 5000 *kg* Druck gebenden Kniehebel-Schrauben-Presse, welche mir von C. Gerhard in Bonn geliefert wurde.

Bei kleineren Mengen benutzt man Tücher, in welche man den Brei einschlägt, und welche man als Paket unter die Presse bringt, bei größeren Mengen Beutel aus starkem Leinen, und ich wende zu diesem Zweck Beutel ohne Naht an, wie sie von den Bankiers zur Versendung von Geldmünzen benutzt und von Wenzel & Hoos in Lauterbach (Oberhessen) fabriziert werden.

Sind, wie es häufig bei Pflanzen- und Tierstoffen der Fall ist, die zu pressenden Substanzen dickflüssig oder schleimig, so muß man sehr langsam und vorsichtig pressen, weil sonst alle Tücher oder Beutel zerreißen, und man kommt in diesen Fällen meistens am besten mit einer Gewichtspresse zum Ziel. Diese konstruiert man auf die Weise, daß man unter einen schweren Schrank oder in eine Mauernische einen sehr starken Holzstock oder einen dünnen Balken mit einem Ende steckt und nahe diesem Ende unter den Balken ein etwas schräg liegendes, mit erhobenen Rändern und Ablaufschnauze versehenes Brett bringt. Auf dieses Brett und unter den horizontal liegenden, frei schwebenden Balken und ein unter den Balken gelegtes Brettchen legt man die zu pressende Substanz, welche durch das Gewicht des schwebenden Balkens bald Flüssigkeit abgibt. Um stärkeren Druck zu erhalten, beschwert man das äußere frei schwebende Ende des Balkens, indem man einen Eimer daran hängt und in diesen allmählich Gewichte bringt. Durch diesen regelmäßigen, allmählich gesteigerten Druck gelingt es meistens, auch die schwierigsten Stoffe ohne Bruch des Preßbeutels auszupressen.

Wenn die Pflanzen- oder Tiersubstanzen nicht wasserreich genug sind oder wenn es sich um trockene Substanzen handelt, muß man sie natürlich mit Wasser vermischen oder kochen, oder man wendet Alkohol oder andere Flüssigkeiten an. Das Erhitzen mit Alkohol muß in einem Ballon am Rückflußkühler und im Wasserbade geschehen, und als Rückflußkühler genügt häufig ein in den Kork des Ballons eingefügtes 1 *m* langes und 6 bis 7 *mm* weites Rohr.

Die durch Pressen erhaltenen, wenn nötig filtrierten Lösungen dampft man dann bis zu einer gewissen Konsistenz, und zwar meistens zum Sirup ab. Wenn wenig oder keine anderen Substanzen als Wasser vorhanden sind, tritt die Kristallisation, besonders nach dem Impfen, d. h. dem Einbringen einer Spur der kristallisierten Substanz, mehr oder weniger schnell ein.

Wenn aber andere Substanzen, wie sie in pflanzlichen oder tierischen Substanzen nie fehlen, in größerer Menge vorhanden sind, wird die Kristallisation oder die Abscheidung in anderer Form verzögert oder ganz verhindert, und dann muß eine Entfernung dieser Substanzen vorhergehen (s. später).

Beispiele der direkten Kristallisation von Zuckerarten sind die Kristallisation von Glukose (Traubenzucker) aus Honig oder aus abgedampftem diabetischen Harn, Traubensaft etc. sowie das „Auszuckern“ der Pflaumen, Datteln, Rosinen etc., welche Gemenge von Glukose und Fruktose enthalten; ferner gehört hierher teilweise das Kristallisieren von Rohrzucker aus wenig gereinigtem Ahornsaft.

Aus den meisten rohen Pflanzensäften oder tierischen Flüssigkeiten erhält man jedoch auf diese direkte Weise nur wenig oder gar nichts der gewünschten Zuckerarten, weil die Beimengungen das Kristallisieren der Zuckerarten hindern, und so scheiden z. B. direkt Zuckerrohrsäfte wenig und Rübensäfte fast gar keinen Zucker ab, weil zu viel Beimengungen in diesen Pflanzensäften vorhanden sind.

II. Kristallisation nach vorheriger Reinigung der Lösungen.

1. Allgemeines.

Man erhält bessere Ausbeuten, wenn man die Säfte vor dem Eindunsten reinigt, und dies geschieht, je nach der Natur der Beimengungen, auf verschiedene Weise.

Diese Reinigung ist zuweilen leicht zu bewirken, zuweilen jedoch schwer, und eine etwas ausführlichere Beschreibung der meistens angewandten Methoden möchte deshalb von Nutzen sein, und dies um so mehr, da dieselben Methoden auch zur Reinigung der durch hydrolytische Zersetzung anderer Kohlenhydrate, Glykoside etc. gewonnenen Lösungen in Gebrauch sind.

Aufkochen und Filtrieren von Pflanzensäften sind zuweilen vorteilhaft, weil hierbei Eiweiß etc. gefällt und entfernt wird. Besser geschieht diese Entfernung, wenn beim Aufkochen Zusätze gegeben werden.

So bewirkt man die Reinigung der Zuckerrüben- und Zuckerrohrsäfte durch Aufkochen mit Kalk unter Einleiten von Kohlensäure und schwefeliger Säure (Kohlendioxyd und Schwefeldioxyd). Hierdurch werden außer den Eiweißstoffen auch organische Säuren und anderes gefällt, und nachher werden die Niederschläge durch Filtration entfernt.

Wenn ferner aus abgerahmter Milch der Milchzucker gewonnen werden soll, entfernt man den Käsestoff durch Lab und das Albumin durch Aufkochen, worauf eine weitere Reinigung mit Aluminiumsalz folgen kann.

Zuweilen ist einfaches Klären der Lösungen genügend, oder es ist dies auch bei der Anwendung anderer Reinigungsmethoden erforderlich.

2. Klären trüber Lösungen.

Um suspendierte sehr feine Teilchen, wie Tonpartikelchen, Bakterientrübungen und derartiges, zu beseitigen, genügt häufig das Passieren durch Papier nicht. Zuweilen gelingt es dann, durch Saugen durch *Pukall*sche Filter aus gebranntem Ton klare Flüssigkeiten zu erhalten.

Am besten ist die Berührung der sehr feinen kolloidalen Teilchen mit gröberen, wohl auch mit kolloidalen, Fällung bewirkenden Teilen, welche die ersteren adsorbieren, auf sich konzentrieren und sie am Passieren der Filter hindern. So ist sehr gebräuchlich das Schütteln trüber Flüssigkeiten mit Aluminiumhydroxyd, welches man aus Ammoniakalaun mit Ammoniak fällt, sehr gut mit Wasser wäscht, und ohne es zu trocknen,

unter Wasser vorrätig hält: schon ein geringer Zusatz bewirkt, daß man schöne klare Filtrate erhält.

Auch die Reinigung durch Kohle oder Metallsalze (s. unten) wirkt auf ähnliche Weise.

Klärung, besonders von etwas schleimigen Pflanzensäften, Honigauflösung etc. kann man durch Schütteln dieser Flüssigkeiten mit durch Kochen in Wasser zerfasertem Filtrierpapier oder der im großen zur Klärung von Zuckersäften, Bier usw. empfohlenen Holzzellulose erreichen, und ebenfalls mit Kieselgur. Die Filtrate der mit diesen Stoffen geschüttelten Flüssigkeiten sind meistens klar.

Ähnliches erreicht man seit langem, wenn man die trüben Flüssigkeiten, z. B. Wein, mit etwas weißem Ton (Bolus) schüttelt und dann einige Tage absitzen läßt, wobei die trübenden Teile sich mit dem Ton zu Boden setzen. Nach *Rona* und *Michaelis*[1]) kann man z. B. aus 100 cm^3 mit Wasser stark verdünnten Blutserums durch Zusatz von 20—25 *g* Kaolinpulver das Eiweiß mit dem Kaolinpulver niederschlagen. Wenn die Gegenwart von Kalk nicht schadet, kann man durch Zusatz von wenig Kalkmilch rasches Absitzen des Tones bewirken.

Wie der in kolloidaler Suspension befindliche Ton wirkt nach *Michaelis* und *Rona*[2]) auch kolloidal gefällter Mastix, indem er Eiweiß niederreißt und die Flüssigkeit klärt. Man setzt z. B. zu mit dem 3fachen Volum absoluten Alkohols vermischtem Blut eine 50%ige Lösung von Mastix in absolutem Alkohol, darauf Wasser, bis der Alkoholgehalt der Flüssigkeit auf 30% gesunken ist, ferner wenig Essigsäure und etwas Magnesiumsulfatlösung. Nach einiger Zeit filtriert man.

3. Reinigung durch Alkohol.

Manche organische Stoffe und besonders die nicht oder schwer kristallisierenden Kolloidstoffe, wie Eiweiß, Gummistoffe und manche andere, sind in Alkohol schwerer löslich als die Zuckerarten, und folglich werden die Säfte — sei es im ursprünglichen, sei es im eingedickten Zustande — mit starkem Alkohol so lange versetzt, wie noch eine erhebliche Abscheidung entsteht, worauf man die Flüssigkeit so lange sich selbst überläßt, bis sie möglichst klar geworden ist. Man dekantiert dann die Flüssigkeit von festem oder flüssigem Bodensatz, filtriert, wenn nötig, und destilliert den Alkohol ab.

Den so erhaltenen reineren Sirup stellt man, eventuell nach dem Impfen (s. S. 54) zum Kristallisieren beiseite.

Sind nach der Behandlung mit Alkohol, Beseitigung des Niederschlages und Eindunstung die Sirupe noch dunkel und unrein, so wieder-

[1]) *P. Rona* und *L. Michaelis*, Weitere Beiträge zur Methodik der Enteiweißung. Bioch. Zeitschr. Bd. 5. S. 367 (1907).

[2]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, Eine Methode zur Entfernung von Kolloiden aus ihren Lösungen, insbesondere zur Enteiweißung von Blutserum. Bioch. Zeitschr. Bd. 2. S. 219 (1907).

holt man die Behandlung mit Alkohol, indem man den Sirup entweder in der Kälte mit seinem doppelten oder mehrfachen Volum Alkohol schüttelt oder ihn am Rückflußkühler im Wasserbade unter Schütteln erwärmt, dann erkalten läßt, nach dem Klarwerden von meistens am Glase festsitzendem Gummi abgießt und wieder verdunstet.

Mit Vorteil setzt man der alkoholischen Flüssigkeit kleine Mengen (bis zu $^1/_3$ oder $^1/_2$ der Flüssigkeit) Äther zu, welcher die gummiartigen Beimengungen viel leichter als der Alkohol fällt, aber, falls er in zu großer Menge zugesetzt wird, leicht großen Verlust an Zucker veranlassen kann,



Fig. 4.

weil er aus alkoholischer Lösung manche Zuckerarten ziemlich vollständig fällt.

Falls die abgegossenen alkoholisch-ätherischen Flüssigkeiten noch zu unrein sind, erwärmt man sie nach dem Eindunsten von neuem mit Alkohol, setzt nach dem Erkalten Äther hinzu, schüttelt, gießt später vom gefällten Gummi ab, verdunstet usw.

Man kann die ausgefällten, dunklen, amorphen Massen mit sehr wenig Wasser durch Erhitzen im Wasserbade wieder verflüssigen, dann mit Alkohol wieder fällen und so eine neue alkoholische Lösung, welche den bei der ersten Fällung etwa niedergeschlagenen Zucker enthält, gewinnen, doch

ist oft die Quantität Zucker, welche man auf diese Weise gewinnt, gering, und es sind solche Operationen nicht immer vorteilhaft.

Den alkoholischen Flüssigkeiten setzt man, um etwa vorhandene oder auftretende Spuren starker Säuren unschädlich zu machen, etwas gefälltes Calciumkarbonat zu.

Das Abdestillieren der alkoholischen Lösungen kann man aus einer großen Retorte im Wasserbade bewirken; sehr viel schneller und wegen geringerer Zersetzung vorteilhafter benutzt man jedoch hierzu einen Vakuumapparat.

Falls man große Quantitäten Flüssigkeit zu bewältigen hat, benutzt man Vakuumapparate aus Kupfer, wie sie die Handlungen chemischer oder pharmazeutischer Apparate bieten; bei kleineren Quantitäten benutzt man mit Vorteil den Apparat, welchen ich nach dem Vorbilde *Soxhlets*[1]) mir konstruiert habe[2]) (s. Fig. 4 auf voriger Seite).

Ein gegen 5 *l* fassender starker Rundkolben[3]) wird in schräger Stellung auf einem Wasserbade erhitzt. Durch den gut schließenden Kautschukstopfen des Kolbens passieren 2 Rohre; ein engeres, zu einer Spitze ausgezogenes, welches wenigstens zur Mitte des Kolbens reicht, und ein weiteres, kurzes, aus welchem die Dämpfe in einen sehr wirksamen Kühler geführt werden.

Das enge Rohr ist oberhalb des Stopfens mit einem Stückchen Kautschukrohr und einem Schraubenquetschhahn verschlossen.

Der Kühler, in welchen die Dämpfe eintreten, besteht aus einem 4 *m* langen, zur Spirale gebogenen Kupferrohre, welches von einem kupfernen Mantel umgeben ist, durch welchen kaltes Wasser strömt. Dieser Kühler ist im Kautschukstopfen des mittleren Tubus einer dreihalsigen Flasche befestigt, welche den kondensierten Alkohol oder das Wasser aufnimmt; der 2. Tubus enthält das zur Sicherheitsflasche der Strahlpumpe führende Rohr, und der 3. Tubus, in welchem ein während der Destillation verschlossenes, nachher zu verlängerndes Heberrohr befestigt ist, dient zur Entleerung der Flasche.

Da alkoholische Flüssigkeiten beim Sieden im Vakuum meistens Siedevorzug und darauf sehr heftiges Stoßen und Aufschäumen zeigen, bringt man mit großem Vorteil im Destillationskolben eine sehr gelinde Wasserstoffquelle an, indem man etwas um ein Stück Zink gewickeltes und am Zink mit einem Faden befestigtes Magnesiumband an einem zwischen Kolbenhals und Kautschukstöpsel eingeklemmten Faden so einhängt, daß es am Boden des Kolbens liegt. Auf diese Weise findet die

[1]) *Soxhlet*, Vakuumverdampfapparat für Laboratoriumszwecke. Chem.-Ztg. Bd. **18**. Jg. 1894. S. 721.

[2]) *Widtsoe* und *B. Tollens*, Über Arabinose, Xylose und Fukose aus Traganth. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. **33**. S. 33. 135. Anm. 1 (1900).

[3]) Die Rundkolben, welche ich benutze, werden mir von Herrn Oppermann in Hohenbüchen bei Delligsen geliefert.

Destillation völlig regelmäßig statt, und der Alkohol fließt, sobald das Wasserbad in gutem Sieden ist, im Strahl aus dem Kühler in die *Wulf*sche Flasche.

Wenn gegen Ende der Destillation die Flüssigkeit fast nur wässeriger Natur ist, fließt oder tropft das Kondensat langsamer, und es tritt häufig starkes Aufschäumen ein, zu dessen Mäßigung man durch gelindes Öffnen des auf dem engen Rohre befindlichen Schraubenquetschhahnes etwas Luft eintreten läßt.

Wenn der bei der Destillation gebliebene Sirup rein genug ist, gießt man ihn in eine Schale, bedarf er noch der Reinigung, so behandelt man ihn im Kolben selbst mit Alkohol und eventuell Äther.

4. Reinigung durch Zusätze, besonders von metallischer Art.

Ein sehr gebräuchliches Mittel der Reinigung ist die Anwendung von Bleisalzen, und hier benutzt man zuweilen das neutrale Bleiacetat (Bleizucker), häufiger jedoch und mit Vorliebe das basisch-essigsaure Blei, d. h. den sog. Bleiessig der Apotheken.

Der Bleiessig gibt mit Eiweißstoffen, Farbstoffen, organischen Säuren, speziell mit Gerbstoffen und mit mancherlei anderen Substanzen dicke, flockige, mehr oder weniger gefärbte Niederschläge, und die Filtrate sind meistens heller oder wasserklar.

Diese stets ziemlich viel Blei enthaltenden Filtrate werden mit Schwefelsäure (unter Vermeidung eines Überschusses) oder mit Schwefelwasserstoff behandelt, worauf man das Bleisulfat oder das Schwefelblei abfiltriert.

Die so erhaltene Flüssigkeit, welche besonders, falls man das Blei als Schwefelblei entfernt hat, hell und klar ist, wird mit wenig Calciumkarbonat versetzt, um Spuren starker Säuren unschädlich zu machen, und dann eingedampft, wobei sie Essigsäure verliert und worauf sie kristallisiert, falls ihr Gehalt an Zucker nicht zu gering ist.

Stärker als Bleiessig allein, wirkt ein Gemisch desselben mit Ammoniak oder aber das unter anderem von *E. Fischer*[1]) benutzte sogenannte zweibasische Bleiacetat (wohl $C_2 H_3 O_2 . Pb OH + H_2 O$) oder noch stärker basische Bleiacetate, welche man direkt darstellt oder deren Bildung in der Flüssigkeit man durch gleichzeitigen Zusatz von Baryt, Ammoniak oder anderen Basen veranlassen kann.

Man muß jedoch bedenken, daß durch die basischen Bleisalze nicht nur färbende und die Kristallisation der Zucker hindernde Stoffe, sondern auch mehr oder weniger der Zuckerarten gefällt werden können. So wird z. B. nach *Reiss*[2]) und nach *E. Fischer*[3]) die Mannose und nach *Ruff*[4])

[1]) *E. Fischer* und *Oscar Piloty*, Über eine neue Pentonsäure und die zweite inaktive Trioxyglutarsäure. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. **24**. S. 4220 (1891).

[2]) *Reiss*, Landwirtschaftliche Jahrbücher v. *Nathusius* und *Thiel*. Jg. **1889**. S. 711.

[3]) *E. Fischer* und *Hirschberger*, Über Mannose III. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **22**. S. 1155 (1889).

[4]) *Otto Ruff*, d- und r-Arabinose. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. **32**. S. 554 (1899).

die d-Arabinose leicht gefällt: beim Versetzen von mit Bleiessig gereinigtem Harn mit Bleiessig und Ammoniak wird nicht nur der Inosit, sondern auch ein Teil des Zuckers gefällt, zur Reinigung der Ribose ist die Fällung durch das zweibasische Acetat mit Baryt angewandt, und beim Versetzen von Rübensäften mit Bleiessig darf man, besonders bei Gegenwart von Alkohol, nicht zu viel Bleiessig anwenden, weil sonst ein Teil des Zuckers in den Niederschlag geht[1]) oder wenigstens die Polarisation zu niedrig ausfällt.

Statt der Bleisalze mit oder ohne Zusatz von Ammoniak oder anderen basischen Substanzen kann man in manchen Fällen Schütteln mit (feucht aufbewahrtem) gefälltem Beihydroxyd anwenden.

Man kann diese Methoden kombinieren, indem man z. B. den Pflanzensaft oder den Harn usw. erst mit Bleizucker und dann mit Bleiessig fällt (siehe z. B. die Abhandlungen von *Neuberg* bei Glukuronsäure oder von *Rosenberg*[2]), dann, nach Entfernung des im Filtrat von dem Bleiessigniederschlage enthaltenen Bleis, eindunstet und den Sirup mit Alkohol und eventuell etwas Äther behandelt, wodurch noch Gummistoffe entfernt werden, usw.

Quecksilbersalze sind ebenfalls als Fällungsmittel für Eiweißstoffe, Amidstoffe etc. wirksam.

So ist das salpetersaure Quecksilberoxyd oder Merkurinitrat von *E. Schulze* und seinen Mitarbeitern vielfach zur Reinigung der Pflanzenextrakte von Amidstoffen benutzt worden. Er schüttelt das kristallisierte Merkurinitrat mit Wasser und etwas Salpetersäure, filtriert die zu verwendende Lösung von dem ungelösten basischen Salz ab und fügt noch Natriumkarbonat hinzu, bis sich ein Niederschlag zu zeigen beginnt.[3]) Das ungelöst Gebliebene des Quecksilbernitrates liefert gleichfalls eine zur Fällung des Glutamins geeignete Lösung, wenn man es mit verdünnter Salpetersäure erwärmt.

Eine Lösung von Jodquecksilber in Jodkalium ist wie zur Reinigung von glykogenhaltigen Flüssigkeiten von Eiweißstoffen, auch bei manchen anderen Gelegenheiten brauchbar.

Von *Hlasiwetz* und *Habermann*[4]) ist Zinnchlorür zur Verbesserung der durch Zersetzung von Proteinstoffen mit Salzsäure erhaltenen Flüssigkeiten angewandt. Zu der Mischung von $^1/_2$ *kg* Kasein mit 1 *l* starker Salzsäure haben sie 1 *l* Wasser und 375 *g* kristallisiertes Zinnchlorür gebracht. Das Zinn wird nachher mit Schwefelwasserstoff ausgefällt.

Von guter Wirkung sind auch Eisen-, Kupfer- und Zinkhydroxyd (respektive Zinkkarbonat), welche in der Flüssigkeit selbst durch Zusatz der betreffenden Metallsalze und Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium-

---

[1]) Siehe *v. Lippmann,* Zuckerarten. S. 1186.

[2]) *Rosenberger,* Über eine Heptose im menschlichen Urin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **49**. S. 205 (1906).

[3]) Persönliche Mitteilung von Prof. *E. Schulze.*

[4]) *Hlasiwetz* und *Habermann*, Über die Proteïnstoffe. Ann. Chem. Bd. **169**. S. 150 (1873).

oder Baryumkarbonat hervorgerufen werden, flockig oder gallertartig sind und Unreinigkeiten niederreißen.

Auch Ferriacetat ist benutzt worden, ferner durch Dialyse erhaltenes kolloidales Eisenhydroxyd[1]) und hierher gehört auch die von *Stutzer*[2]) gefundene Methode der Eiweißfällung mit Kupfervitriol und Natronlauge.

Ferner ist Aluminiumsulfat mit der äquivalenten Menge Baryum- oder Calciumhydroxyd oder Calciumkarbonat (siehe Milchzuckerdarstellung) brauchbar.

Ein anderes Reinigungsmittel, welches besonders von *E. Schulze*[3]) neuerdings vielfach angewandt wird, ist die schon von *Scheibler*[4]) empfohlene Phosphorwolframsäure, sie fällt Alkaloide und stickstoffhaltige Substanzen, wie Amidstoffe, Basen mancherlei Art, Betain, ferner Farbstoffe usw. aus, und die überschüssig zugesetzte Phosphorwolframsäure kann man mittelst Baryumhydroxyd aus den Filtraten entfernen. Der Niederschlag ist recht voluminös, er läßt sich aber nach *Scheibler* nach längerem Stehen gut abfiltrieren.

Man wendet passenderweise eine 10%ige, wohl auch 25%ige oder nach *Skraup*[5]) eine heiße 50—60%ige Lösung der käuflichen Phosphorwolframsäure an und gibt so lange von derselben zu, wie noch ein Niederschlag entsteht, dann saugt man nach einiger Zeit ab, wäscht mit verdünnter Schwefelsäure aus, versetzt das Filtrat mit Barytwasser, bis der Überschuß an Phosphorwolframsäure gefällt ist, und filtriert. *Geelmuyden*[6]) benutzt zur Fällung von Proteïnstoffen usw. aus Organbrei eine Lösung von 100 *g* Phosphorwolframsäure, 100 *cm*³ Schwefelsäure und 1000 *cm*³ Wasser.

5. Reinigung durch Kohle, Hydrosulfit usw.

Großen Nutzen bringt beim Reinigen von Lösungen die Kohle, welche als Holzkohle, Knochenkohle, Blutkohle allgemein als Mittel zur Entfernung von Farb- und Geruchstoffen dient. Man benutzt sie beim Reinigen von Zuckerarten meistens erst, wenn der größte Teil der Verunreinigungen schon durch Alkohol oder Bleiessig oder durch Kristallisation des Zuckers

---

[1]) *P. Rona* und *L. Michaelis,* Untersuchungen über den Blutzucker. Biochemische Zeitschrift. Bd. 7. S. 332 (1907).

[2]) *Stutzer,* Journ. f. Landw. Jg. 1881. S. 473; siehe auch *König,* Untersuchung etc. 3. Aufl. S. 209.

[3]) *E. Schulze,* Landw. Vers.-Stat. Bd. 36. Anm. S. 419 (1889).

[4]) *Scheibler,* Vortrag auf der 45. und 49. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. 5. S. 801 (1872); Jg. 9. S. 1793 (1876).

[5]) *Skraup,* Über die Hydrolyse des Kaseins durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42. S. 280 (1904).

[6]) *H. Chr. Geelmuyden,* Über den Acetonkörpergehalt der Organe im Coma diabeticum Verstorbener nebst Beiträgen zur Theorie des Acetonstoffwechsels. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58. S. 256 Anm. (1909).

und Beseitigung der Mutterlauge entfernt ist, weil häufig die in den ursprünglichen Säften enthaltenen Farbstoffe nicht genügend adsorbiert werden, so daß man selbst mit großen Mengen Kohle nur ungenügende Reinigung erzielt und man hierbei bedeutenden Verlust an Zuckersubstanz erleiden kann.

Zu ganz oder fast neutral reagierenden Säften kann man, wie dies früher in den Zuckerfabriken allgemein geschah, die rohe Knochenkohle, d. h. bei Luftabschluß geglühte und dann nur mit Wasser gewaschene zerkleinerte oder gepulverte Knochen, nehmen. Besser, und bei sauer reagierenden Flüssigkeiten immer, wendet man die durch Digerieren mit Salzsäure und darauf folgendes gutes Auswaschen mit Wasser von Calcium- und Magnesiumphosphat befreite sog. gereinigte Knochenkohle an, am besten aber benutzt man die von der Fabrik Flemming in Kalk bei Cöln hergestellte sehr wirksame sog. Blutkohle, welche nach Angabe des Herrn Flemming als Nebenprodukt der Blutlaugensalzfabrikation durch Glühen stickstoffhaltiger Substanzen mit Alkali gewonnen wird. Sie ist mit Salzsäure und Wasser von Verunreinigungen möglichst befreit.

Man bringt weniger oder mehr an gepulverter Blutkohle in die Flüssigkeiten, erwärmt gelinde, läßt 1/2 Stunde oder längere Zeit digerieren und sieht bald schon an der Farbe der nach dem Umschütteln sich oben ansammelnden Flüssigkeit, oder an der Randfärbung eines auf Filtrierpapier gebrachten Tropfens, daß Entfärbung eingetreten ist.

Wenn man auch die Flüssigkeit mittelst einer Nutsche von der Kohle absaugt, muß man bedenken, daß die Kohle neben den Verunreinigungen immer etwas Zucker zurückhält, was von verschiedenen Autoren[1]) genau studiert worden ist. Bei Gegenwart von 10% Essigsäure oder Aceton in den Flüssigkeiten findet dies nach *Michaelis* und *Rona*[2]) nicht oder kaum statt.

Die Kohle hält der Hauptsache nach Farbstoffe mancherlei Art, ferner aber auch gummi- oder eiweißartige Stoffe, auch Calciumhydroxyd und verschiedene Metall- und andere Salze zurück. (Siehe über das Verhalten verschiedener Kohlenarten zu Farbstoffen etc. *Glässner* und *Suida*.[3])

Auch durch reduzierend wirkende Stoffe kann man zuweilen mehr oder weniger Entfärbung bewirken, so mit den für den Rübensaft der Zuckerfabriken empfohlenen Stoffen, wie schweflige Säure und Sulfite, Hydrosulfit (dem sog. Blankit der Badischen Anilin- und Sodafabrik), ferner mit Zinkstaub, doch muß man bei diesen Zusätzen stets bedenken, ob sie sich leicht wieder aus den damit behandelten Flüssigkeiten entfernen lassen.

Oxydierende Stoffe, z. B. Salpetersäure, sind ebenfalls einzeln angewandt worden (s. Inosit S. 78).

---

[1]) S. *v. Lippmann*, Zuckerarten. S. 1389.

[2]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, l. c. Biolog. Zeitschr. Bd. **16**. S. 489 (1909).

[3]) *Glässner* und *Suida*, Über die Ursachen der Entfärbung von gefärbten Flüssigkeiten durch verschiedene Kohlen. Ann. Chem. Bd. **357**. S. 95 (1908).

6. Kristallisieren.

Wenn man auf diese Weise zu möglichst gereinigten Sirupen gelangt ist, wird man als Vorteil die Möglichkeit betrachten, schnell ein Urteil darüber zu gewinnen, ob die Sirupe kristallisieren, und welche Zuckerart sich daraus abscheiden wird.

Zu diesem Zweck bringt man auf Mikroskop-Objektträger je einen Tropfen des Sirups und impft je eine Spur verschiedener Zuckerarten mit einer Nadel in die verschiedenen Tropfen[1]), indem man, von einer Seite des Tropfens ausgehend, einige Striche durch den Tropfen zieht. Nun überläßt man mit oder ohne Deckgläser die vor Staub geschützten Objekte einige Tage oder Wochen sich selbst und findet bei täglicher Inspizierung unter dem Mikroskop, ob bei Glukose, Galaktose, Arabinose, Rohrzucker etc. Vermehrung der eingebrachten Kristalle oder die Wege der Impfnadel sichtbar sind, oder ob die eingebrachte Substanz verschwunden ist, was auf Abwesenheit erheblicher Mengen des betreffenden Zuckers deutet.

Dann kann man von dem betreffenden Objekte kleine Mengen in die Hauptquantität des Sirups bringen und wird auch hier Kristallisation allmählich eintreten sehen, und zwar je nach den Substanzen und ihrer Reinheit, nach Stunden, Tagen, Wochen oder Monaten. Tägliches Umrühren der Massen beschleunigt das Kristallisieren. Besonders bei kleinen Quantitäten Substanz muß man hierbei den Feuchtigkeitszustand der Luft berücksichtigen. In sehr trockner Luft, so im Exsikkator, trocknen manche Sirupe zu harten Massen aus, in welchen die Moleküle sich nicht mehr zu Kristallen ordnen können, in Glocken über Wasser dagegen zerfließen schon gebildete Kristalle oft wieder, es ist meistens ein mittlerer Feuchtigkeitsgrad am günstigsten, und der Feuchtigkeitsgehalt der Luft im Keller ist oft der trockneren Luft der geheizten Zimmer vorzuziehen.

Eine große Erleichterung bietet beim Aufsuchen von Zuckerkristallen unter dem Mikroskop das polarisierte Licht, welches, bei der Anbringung des einen *Nicol*schen Prismas unter dem Objekttisch und des anderen am Okular, die Kristalle auf dunklem Grunde hell erscheinen läßt. Falls noch eine Gipsplatte am unteren Nicol eingeschaltet ist, heben sich die hellen Kristalle besonders vom blau gestellten Gesichtsfelde schön farbig ab.

Zuweilen kann man auch aus den Gestalten der Kristalle, z. B. den Sechsecken der Galaktose, den häufig gestreiften, breiteren Kristallen der Xylose, den feineren, meistens sternförmig gruppierten Nadeln der Arabinose, den mehr kompakten Kristallen des Rohrzuckers, Schlüsse auf die Natur des betreffenden Zuckers ziehen.

Wenn nach kürzerer oder längerer Zeit der Sirup mit Kristallen erfüllt ist, sucht man die Kristalle durch Absaugen auf einer mit einer

---

[1]) *J. A. Widtsoe* und *B. Tollens*, Über Arabinose, Xylose und Fukose aus Traganth. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 33, S. 135, Anm. 2 (1900).

Scheibe Filtrierpapier belegten Porzellannutsche[1]) (s. Fig. 5) oder mittelst einer kleinen Zentrifuge zu reinigen, man befeuchtet nach dem Absaugen oder Abschleudern mit einigen Tropfen verdünnten Alkohols, saugt wieder usw. Die Muttersirupe können dann weiter gereinigt werden und neue Mengen Kristalle liefern. Statt des Absaugens kann man auch die mit Sirup gemengten Kristalle in einem Leinensäckchen pressen.

Mit großem Vorteil streicht man die Kristalle enthaltenden Massen auf poröse Tonplatten oder Tonteller (z. B. von Villeroi und Boch in Schramberg), welche im Laufe einiger Tage und in nicht zu trockener Luft die Muttersirupe einsaugen.



Fig. 5.

Die weitere Reinigung geschieht durch Umkristallisieren aus Wasser oder, da die meisten Zuckerarten sehr leicht löslich in Wasser sind, aus verdünntem Alkohol.

Zum Unkristallisieren von z. B. Glukose bediene ich mich meistens der folgenden Methode: Man schmilzt den Zucker in Bechergläsern mit so wenig Wasser wie möglich (etwa $^1/_4$ des Zuckergewichts) im Wasserbade oder vorsichtig auf einer kleinen Flamme unter fortwährendem Umrühren, setzt der so erhaltenen, ziemlich klar gewordenen dicken Flüssigkeit ihr $1^1/_2$- bis 2faches Volum starken Alkohols zu, ferner Blutkohle, digeriert einige Zeit unter gelinder Erwärmung und filtriert durch ein im Heißwassertrichter befindliches Sternfilter, welches mit einer Uhrschale bedeckt wird.

Um ein Entzünden des Alkohols durch die Heizflamme zu verhindern, befindet sich zwischen dem Filtriertrichter und dem Heizapparat eine Wand aus Blech. Selbstverständlich kann die Heizung des Filters auch durch umgelegte Metallröhren, durch welche Dampf streicht, durch elektrische Heizung etc. bewirkt werden.

Die meistens zuerst etwas schwärzlich durchlaufende Flüssigkeit gießt man wieder auf das Filter, bis sie klar läuft.

Die Kristallisiergefäße dürfen nicht aus zu schwachem Glase sein, weil sie durch zu kräftige Kristallisationen gelegentlich gesprengt werden können.

Durch Impfen und häufiges Rühren befördert man die Kristallisation. Schließlich saugt man den Zucker auf der Nutsche trocken, befeuchtet ihn mit erst schwächerem, dann starkem Alkohol, saugt diesen und

[1]) Die *Büchner*schen Filtriertrichter aus Porzellan oder die sogenannten „Nutschen" sind von großem Vorteil beim Filtrieren, weil der Atmosphärendruck die Flüssigkeit sehr leicht durch die große Filtrierfläche treibt. Apparate, welche entweder höheren Atmosphärendruck oder auch, wie in den Filterpressen der Fabriken, höheren Flüssigkeitsdruck auf die filtrierende Substanz ausüben, sind ebenfalls hier und da in Gebrauch.

schließlich etwas Äther durch, worauf man den Zucker an der Luft oder über Schwefelsäure trocknen läßt.

III. Darstellung von Zuckerarten durch Fällung derselben mittelst anderer Substanzen und Wiederabscheidung aus den Niederschlägen.

1. Fällung mittelst alkalischer Stoffe.

Meistens sind die losen Verbindungen der Zuckerarten mit Kali oder Natron in Alkohol schwer löslich, man kann also beim Versetzen von diabetischem Harn mit etwas Kaliumhydroxyd und nicht zu wenig Alkohol eine sirupförmige Fällung hervorbringen, welche sich beim Schütteln an das Glas hängt, und von welcher man dann die Flüssigkeit abgießt.

Aus der Alkaliverbindung kann man den Zucker durch Zusatz von Alkohol und soviel Tropfen verdünnter Schwefelsäure, daß Lackmus eben noch nicht gerötet wird, freimachen und durch Verdunsten der filtrierten Lösung reiner gewinnen (siehe Glukose).

Wichtig ist die Verwendung der alkalischen Erden, Baryt, Strontian, Kalk, welche mit Fruktose und besonders mit dem Rohrzucker in Wasser schwer lösliche oder unlösliche Niederschläge geben.

Man kann Baryumhydroxyd anwenden, welches von *Dubrunfaut* zur Gewinnung von Rohrzucker aus Melasse empfohlen war; meistens wendet man aber zu dem Zwecke der Entdeckung und Fällung des Rohrzuckers, sowohl im größten Maßstabe aus der Melasse, als auch im kleinen zur Entdeckung desselben in Pflanzenstoffen, das Strontiumhydroxyd an.

Das Calciumhydroxyd kann zu dem gleichen Zwecke dienen, wird jedoch hauptsächlich zur Fällung der Fruktose benutzt.

Die Verbindungen des Rohrzuckers mit den obigen Basen, die Saccharate, scheiden sich besonders in der Hitze und bei Gegenwart von Alkohol leicht ab; sie werden durch Absaugen und Waschen mit Lösungen der Basen und eventuell Alkohol gereinigt und dann nach dem Verteilen in Wasser durch Einleiten von Kohlendioxyd oder durch Oxalsäure in Strontium- oder Calciumkarbonat resp. -Oxalat und Zuckerlösung zersetzt, welch letztere, vielleicht nach der Reinigung mit Kohle und nach dem Eindunsten, den Zucker liefert. Besonders *E. Schulze*[1]) hat auf diese Weise in sehr vielen Pflanzenstoffen Rohrzucker nachgewiesen.

Auch mit Hilfe von Bleiessig mit oder ohne Zusatz von etwas Ammoniak lassen sich einige Zucker oder zuckerartige Stoffe fällen. Die Niederschläge werden abfiltriert, ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff oder bequemer mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt.

Die nach dem Abfiltrieren des Bleisulfids oder -sulfats gewonnene Flüssigkeit enthält den Zuckerstoff.

[1]) *E. Schulze*, Über den Nachweis von Rohrzucker in vegetabilischen Substanzen. Landwirtsch. Vers.-Stat. Bd. **34**. S. 408—413 (1887). — *E. Schulze* und *Th. Seliwanoff*, Über das Vorkommen von Rohrzucker in unreifen Kartoffelknollen. Landwirtsch. Vers.-Stat. Bd. **34**. S. 403—407 (1887).

So wird besonders der Inosit des Harns gewonnen, ebenso z. B. die d-Arabinose (siehe im speziellen Teile) und Ribose.

Durch Zusatz von Kupfervitriol und Natriumhydroxyd in fast äquivalentem Verhältnis (5 Mol. $CuSO_4 + 5 H_2O$ und 11 Mol. NaOH) werden nach *Salkowski* und *Yoshimato* [1]) alle Glykosen aus ihren Lösungen fast völlig gefällt.

2. Fällungen mittelst der Phenylhydrazine.

Die Hauptrolle bei den Fällungen der Zuckerarten kommt dem von *E. Fischer* [2]) entdeckten und eingeführten Phenylhydrazin und seinen Substitutionsprodukten zu, und erst seit der Benutzung dieser Stoffe ist die Bereitung und die Entdeckung mancher Zuckerarten, selbst bei Anwendung sehr unreiner Ausgangsmaterialien möglich.

Das Phenylhydrazin und die substituierten Phenylhydrazine bilden mit den Zuckerarten zwei Arten von Verbindungen: *a)* die Phenylhydrazone aus 1 Mol. Zucker und 1 Mol. Phenylhydrazin und *b)* die Phenylosazone aus 1 Mol. Zucker und 2 Mol. Phenylhydrazin (unter Verlust von 2 Atomen Wasserstoff, welche anderweitig verbraucht werden). z. B. mit Glukose:

$$a)\ \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Phenylhydrazin}}{C_6H_5.NH.NH_2} = \underset{\text{Glukose-Phenylhydrazon}}{C_6H_{12}O_5:N.NH.C_6H_5}$$

$$b)\ \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Phenylhydrazin}}{2\,C_6H_5.NH.NH_2} = \underset{\text{Glukose-Phenylosazon.}}{C_6H_{10}O_4(N.NH.C_6H_5)_2} + 2\,H$$

Von diesen sind die Osazone meistens die in Wasser schwerer löslichen Verbindungen, und sie scheiden sich im allgemeinen leicht ab: sie sind jedoch — so brauchbar sie auch zur Entdeckung der Zuckerarten sind — nicht zur Darstellung zu benutzen, denn man kann die Phenylosazone zwar mit konzentrierter Salzsäure zersetzen und das Phenylhydrazin als Hydrochlorat abscheiden, aber die daneben wieder freiwerdende Substanz ist nicht der ursprünglich vorhanden gewesene Zucker, sondern das 2 H weniger enthaltende Oson, welches erst beim Behandeln mit Zink und Essigsäure in Zucker übergeht. Bei diesen Zersetzungen ist zu bedenken. erstens, daß sie recht umständlich und schwer auszuführen sind, und zweitens, daß häufig nicht der ursprünglich vorhandene Zucker, sondern ein anderer erhalten wird. So liefern z. B. Glukose, Mannose und Fruktose nicht drei verschiedene Phenylosazone, sondern nur eins, und aus diesem entsteht immer dasselbe Oson, $C_6H_{10}O_6$, welches in allen drei Fällen mit Zinkstaub und Essigsäure dieselbe Glykose, d. h. Fruktose oder Lävulose, $C_6H_{12}O_6$, liefert.[3])

---

[1]) *Salkowski* und *Yoshimato,* Über die Fällbarkeit von Zuckerarten durch Kupferhydroxyd. Chemiker-Zeitung. Jg. 1908. Repert. S. 502, das. nach Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **56**. S. 425 (1908).

[2]) *E. Fischer,* Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten. I. Siehe z. B.: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **17**. S. 579 (1884); II. Jg. **20**. S. 821 (1887).

[3]) *E. Fischer,* Über die Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten. V. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **22**. S. 87, 94 (1889).

Die Phenylhydrazone sind dagegen sehr brauchbar zur Gewinnung der Zuckerarten, wenn sie, wie z. B. bei der Mannose, sehr schwer oder, bei der Fukose, der Rhodeose, der Rhamnose, ziemlich schwer in Wasser löslich sind, denn aus den Phenylhydrazonen lassen sich die in denselben befindlichen Zuckerarten leicht wieder isolieren.

Die Darstellung der Phenylhydrazone geschieht durch Mischen der Syrupe, in welchen die Zuckerarten vorhanden sind, mit nicht zu viel Wasser (dem ein- bis dreifachen Volum), etwas mehr Phenylhydrazin, als der vermuteten Menge Zucker entspricht und zuweilen der dem Phenylhydrazin äquivalenten Menge Essigsäure. So scheiden sich Mannose-Phenylhydrazon und z. B. Rhamnose- und Fukose-Phenylhydrazon ab.

Wenn die substituierten Phenylhydrazine (z. B. das Di-Phenylhydrazin) in Wasser schwerer löslich sind, setzt man Alkohol zu, und zuweilen muß man mehr oder weniger hoch erwärmen (siehe Arabinose-Di-Phenylhydrazon).

Die nach kürzerer oder längerer Zeit ausgefällten Phenylhydrazone werden abfiltriert, abgesogen und, wenn es nötig ist, aus Wasser oder Alkohol umkristallisiert. Hierbei kann man nach *Neuberg*[1]) Pyridin zusetzen, welches die meisten Hydrazone und Osazone leicht löst.

Zur Abscheidung des Zuckers aus den Phenylhydrazonen kann man die letzteren nach dem ursprünglichen Verfahren von *E. Fischer* mit konzentrierter Salzsäure zersetzen, wobei salzsaures Phenylhydrazin neben dem Zucker entsteht und, nach Entfernung der Salzsäure durch Bleikarbonat und anderes, der Zucker regeneriert wird.

Besser als nach dieser umständlichen Methode verfährt man aber nach den Methoden von *Herzfeld*[2]) und von *Ruff*[3]), indem man die Phenylhydrazone mit Benzaldehyd und die substituierten Phenylhydrazone (Methylphenylhydrazon, Diphenylhydrazon etc.) mit Formaldehyd zersetzt.

Hierbei wandert die Phenylhydrazingruppe an den Benzaldehyd oder den Formaldehyd und der Zucker wird in Freiheit gesetzt, und so finden z. B. folgende Gleichungen statt:

a) $C_6H_{12}O_5:N.NH.C_6H_5 + C_6H_5COH = C_6H_{12}O_6 + C_6H_5CH:N.NHC_6H_5$
Mannose-Phenylhydrazon — Benzaldehyd — Mannose — Benzaldehyd-Phenylhydrazon.

b) $C_5H_{10}O_4:N.N(C_6H_5)_2 + CH_2O = C_5H_{10}O_5 + CH_2:N.N(C_6H_5)_2$
Arabinose-Di-Phenylhydrazon — Formaldehyd — Arabinose — Formaldehyd-Di-Phenylhydrazon.

[1]) *Neuberg*, Über die Reinigung der Osazone und zur Bestimmung ihrer optischen Drehungsrichtung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 3384 (1899).

[2]) *Herzfeld*, Über die spezifische Drehung der Acetylmaltose und Maltose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **28**. S. 442 (1895); siehe besonders die genaue unter dem Namen *de Wett* veröffentlichte Vorschrift in der Zeitschrift des Vereines der deutschen Zuckerindustrie. Jg. **1895**. II. S. 794.

[3]) *Ruff*, Verfahren zur Reindarstellung und Trennung von Zucker. Ber. d. Deutsch chem. Ges. Jg. **32**. S. 3234 (1899).

Zur Zersetzung mit Benzaldehyd erwärmt man im Wasserbade in einer Flasche am Rückflußkühler das Hydrazon mit ca. 1/4 mehr Benzaldehyd, als z. B. nach dem Verhältnis:

$$\underset{\text{Mannose-Phenylhydrazon}}{C_6H_{12}O_5:N.NH_2.C_6H_5} + \underset{\text{Benzaldehyd}}{C_6H_5.COH}$$

erforderlich ist, und zirka dem vierfachen Gewichte eines Gemenges gleicher Teile Wasser und starkem Alkohol.

Nach 1/2—1 Stunde ist die Reaktion vollendet. Man läßt erkalten, filtriert vom ausgeschiedenen Benzaldehyd-Phenylhydrazon, schüttelt das Filtrat zweimal mit Äther aus, um Benzaldehydüberschuß etc. zu entfernen, entfärbt mit Blutkohle und verdunstet den Zucker zur Kristallisation.

Zur Zersetzung der substituierten Phenylhydrazone übergießt man sie mit 35%igem Formaldehyd und erwärmt am Rückflußkühler. Um die Zersetzung zu erleichtern und bessere Lösung zu bewirken, setzt man etwas Alkohol hinzu.

Nach 1 Stunde läßt man erkalten, schüttelt mehrmals mit Äther aus, entfärbt mit Blutkohle, dampft unter mehrmaligem Zusatz von etwas Wasser ab, bis der Formaldehyd verschwunden ist, usw.

IV. Darstellung von Zuckerarten, welche in der Natur nicht frei, sondern in Verbindung mit anderen Stoffen als Glykoside und gepaarte Substanzen oder als höhere Kohlenhydrate oder Polysaccharide (Zellulose, Hemizellulosen, Stärke, Glykogen, Pentosan) etc. vorhanden sind. Hydrolyse.

a) Allgemeines der Hydrolysen.

Wenn die Zuckerarten, besonders die Glykosen, in der Natur nicht frei, sondern als Glykoside vorkommen, muß ihre Verbindung mit anderen Stoffen gelöst werden, und dies geschieht fast ausnahmslos unter Aufnahme von Wasser (Hydrolyse), hierauf reinigt und verdampft man, eventuell nach Beseitigung des Paarlings, die Flüssigkeit nach den im vorigen Abschnitt angegebenen Methoden.

Wenn nicht die Glykosen selbst, sondern die oben genannten höher kondensierten Stoffe vorliegen, zerlegt man die letzteren ebenfalls durch hydrolytische Operationen, indem man die Zersetzung unter Aufnahme von Wasser bewirkt. So zersetzen sich z. B. Stärke unter Bildung von d-Glukose und Rohrzucker unter Bildung von d-Glukose und Fruktose.

Die Hydrolyse wird meistens durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure bewirkt, bei den Glukosiden und einigen Zuckerarten auch durch Fermente oder Enzyme.

Die Operation läßt man am besten auf die vorher möglichst rein dargestellten zusammengesetzten Stoffe wirken, wie z. B. auf Stärke, Pen-

tosan, Euxanthinsäure, Glykogen, oder auf die vorher aus den Pflanzen isolierten Glykoside, wie Amygdalin usw.

Ist dies aus irgend einem Grunde nicht möglich, so kann man auch die rohen Pflanzenstoffe verwenden, man hat aber in diesen Fällen wegen der Beimengung vieler anderer Stoffe zuweilen mit großen Schwierigkeiten zu kämpfen.

Die Hydrolyse der Glykoside mittelst verschiedener Enzyme erfolgt in wässeriger Lösung meistens leicht, und so zerfällt z. B. das Amygdalin mit Emulsin leicht zu Glukose, Bittermandelöl und Cyanwasserstoff. Man beseitigt die beiden letztgenannten Stoffe durch Abfiltrieren, Ausäthern und Abdampfen und erhält den Zucker in Kristallen.

Zur Hydrolyse mit Säuren benutzt man Konzentrationen, welche von einem Minimum an Schwefel- oder Salzsäure in 100 cm^3, bis zu 1, 3, 5, 7 und mehr Prozenten an Säure wechseln.

Zuweilen unterstützt man die Wirkung von schwacher Säure durch die höhere im Druckkessel oder Autoklaven zu erhaltende Temperatur. Dies ist bei der Darstellung von Glukuronsäure unerläßlich.

Sehr schwache Säure ist z. B. zur Zerlegung von Inulin in Fruktose sowie zur Zerlegung von Rohrzucker in Glukose und Fruktose, das heißt zur sog. Inversion, genügend, und man darf nicht mit stärkerer Säure auf 100° erhitzen, weil sich die entstandene Fruktose sehr leicht unter Bildung von braunen Nebenprodukten zersetzt.

Will man Euxanthinsäure in Euxanthon und Glukuronsäure zerlegen, so kann man dies bei 135° C sogar mit Wasser allein bewirken, und mit ca. $^1/_5$%iger oder 1%iger Schwefelsäure gelingt dies noch besser.

Zur Hydrolyse von Hemizellulosen, wie Mannan, Galaktan, Pentosan etc., muß man stärkere Säuren anwenden, und es sind Schwefelsäure von 1—10%, Salzsäure von 2—8% Gehalt angewendet worden. So führt *Councler*[1]) die Hydrolyse des Holzgummis mit Salzsäure aus, und *Winterstein*[2]) hat gesucht, für Stachyose, Lupeose, Raffinose, Holzgummi die besten Konzentrationen der Salzsäure zu ermitteln.

Wie es von *Ostwald* u. a. bei der Hydrolyse (Inversion) des Rohrzuckers nachgewiesen ist, wirkt auch bei der Hydrolyse der obigen Kohlenhydrate bei gleichen Prozentgehalten die Salzsäure stärker als die Schwefelsäure, und dies ist von *Hauers* und *Tollens*[3]) in betreff der Hydrolyse des Kirschgummi speziell nachgewiesen, z. B. ließen sich nach 2stündigem Erhitzen von Kirschgummi mit 4%iger Salzsäure in der Flüssigkeit 58·68% des Gummi an Glykosen nachweisen, während das Erhitzen mit 4%iger Schwefelsäure davon nur 38·24% hervorgebracht hatte.

[1]) *C. Councler,* Verzuckerung von Holzgummi mittelst Salzsäure. Chemiker-Zeitung. Jg. **1892**. S. 1719.

[2]) *E. Winterstein,* Über die Inversion einiger Kohlenhydrate. Landwirtsch. Vers.-Stat. Bd. **41**. S. 375 (1892).

[3]) *Hauers* und *B. Tollens,* Über die Hydrolyse pentosanhaltiger Stoffe mittelst verdünnter Säuren und mittelst Sulfitflüssigkeit sowie über die Isolierung von Pentosen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 3306 (1903).

Es zeigt sich bei diesen Hydrolysen, daß schon nach kürzerer Zeit viel Glykosen gebildet sind, daß die Zunahme später langsam erfolgt und daß schließlich sich die Reduktionskraft wieder vermindert, und man sieht bei graphischer Darstellung der Resultate von *Hauers* und *Tollens,* daß die zuerst sehr stark ansteigende Kurve nachher fast horizontal wird oder wieder fällt.

Das Fallen der Kurve zeigt an, daß ein Teil der gebildeten Glykosen bei längerem Erhitzen sich zersetzt, sei es in andere Stoffe (bei den Hexosen zu Lävulinsäure und Ameisensäure, bei den Pentosen zu Furfurol, ferner zu Huminstoffen), sei es, daß sog. Reversionsprodukte (siehe *Wohl*[1]) sich bilden.

Da nun schon vor der vollständigen Hydrolyse der Hemizellulosen usw. diese Nebenzersetzungen beginnen, und die Ausbeute durch die Gegenwart von nicht kristallisierbaren Stoffen außerdem sehr geschmälert wird, so erhitzt man nicht gar zu lange und nicht mit zu konzentrierten Säuren.

Beim Kirschgummi wird man so lange erhitzen, bis die oben genannte Kurve ihre Biegung in die Horizontale zum größten Teil beendigt hat, d. h. 4—5 Stunden bei Anwendung von 4%iger Schwefelsäure, und 2 Stunden bei 8%iger Schwefelsäure.

Bei anderen Stoffen müssen die passendste Konzentration der Säuren und die beste Zeitdauer durch den Versuch gefunden werden.

Meistens wird man bei 4—6stündigem Erhitzen mit 4—6%iger Schwefelsäure genügende Resultate erhalten.

Die passendste Menge an verdünnter Säure ist das 7fache der zu zerlegenden Substanz; wendet man weniger an, so ist die Ausbeute an Zucker geringer. Bei sehr voluminösen Substanzen, wie Stroh u. dgl., muß man so viel Säure anwenden, daß die Substanzen wenigstens einigermaßen bedeckt werden.

Da Salzsäure bei gleicher prozentischer Konzentration, wie im allgemeinen, auch bei den obigen Versuchen sich stärker als die Schwefelsäure erwiesen hat, so bietet ihre Anwendung in manchen Fällen Vorteile; sie hat jedoch den großen Nachteil, daß man sie schwerer als die Schwefelsäure aus den Flüssigkeiten entfernen kann, da ihre Salze mit billigen Basen nicht unlöslich oder schwer löslich sind wie Baryum- oder Calciumsulfat.

Bei kleineren Mengen bedient man sich zur Fällung der Salzsäure des Silberkarbonates, bei größeren des Bleikarbonates; das entstehende Chlorblei ist jedoch nicht so schwer löslich wie das Chlorsilber, und man muß nach der Entfernung des Chlorbleis die letzten Teile Chlorwasserstoff dann mit Silberkarbonat fortnehmen (s. Xylosebereitung).

Das Erhitzen mit den Säuren geschieht bei kleineren Mengen in Glaskolben, welche als Rückflußrohr im Korke eine im Innern 6—7 *mm* weite und $^1/_2$ *m* lange Glasröhre tragen; man befestigt den Kolben mittelst

---

[1]) *Wohl*, Zur Kenntnis der Kohlehydrate. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 23. S. 2097 (1890).

eines Halters in einem Wasserbade mit konstantem Zutröpfeln von Wasser und Abfluß, so daß die innere Flüssigkeit ungefähr in gleicher Höhe mit dem äußeren kochenden Wasser steht.

Größere Mengen der Substanzen erhitzt man in Porzellantöpfen (sog. Chlortöpfen) der Berliner königl. Porzellanmanufaktur (s. Fig. 6). Man setzt die Töpfe in ein großes Wasserbad (eisernen Kessel mit Zuflußvorrichtung) indem man direkte Berührung mit dem Boden des Wasserbades durch Einlegen einiger Steine oder auch eines Lumpens verhindert. Man legt während des Kochens im Wasserbade den 2fach durchbohrten Deckel auf und verschließt einen Tubus desselben mit einem Kork, den zweiten mit einem Kork und Steigrohr.

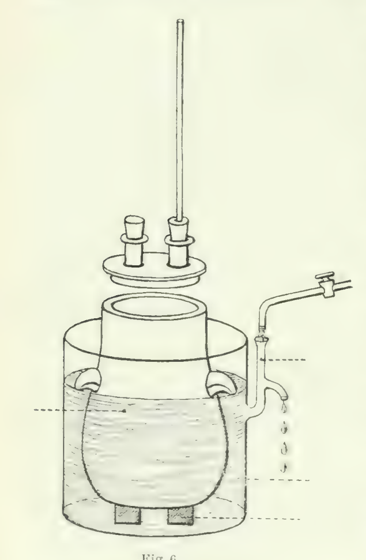


Fig. 6.

Mit solchen Töpfen von 5 oder 10 *l* Inhalt wird man meistens auskommen. Man bringt z. B. zur Darstellung von Arabinose 1 *kg* gemahlenes Kirschgummi und 7 *l* einer 4%igen Schwefelsäure (enthaltend 280 *g* konzentrierte reine Schwefelsäure) in den 10 *l*-Topf. Von sehr voluminösen Stoffen, wie Stroh etc., nimmt man weniger als 1 *kg*, z. B. 800 g.

Wenn die nötige Kochdauer unter zeitweiligem Umrühren verflossen ist, wird der Inhalt der Gefäße von dem unlöslichen abgepreßt, indem man ihn in einen Sack entleert und diesen in eine gute Presse (s. oben) bringt oder bei kleinen Quantitäten die Masse abnutscht.

Die Säure der Flüssigkeit wird dann gesättigt, und zwar bei Anwendung von Schwefelsäure mit gefälltem Calciumkarbonat. Das letztere muß frei von Magnesiumkarbonat sein, weil das aus dem letzteren entstehende Magnesiumsulfat die späteren Operationen hindert. (Gutes Calciumkarbonat habe ich von der Firma Dr. L. C. Marquart in Beuel-Bonn bezogen.)

Man kann die Schwefelsäure natürlich auch mit Baryumkarbonat entfernen, dies ist aber, obgleich es häufig geschieht, abgesehen von der größeren Kostspieligkeit, wenig bequem, weil das Entfernen der großen Menge Baryumsulfat, welche oft kolloidale Beschaffenheit zeigt, viel weniger leicht ist als dasjenige des körnigen Calciumsulfates.

Man trägt in die noch warme und in einer Schale auf dem Wasserbade erhitzte Flüssigkeit allmählich etwas mehr als die für die Schwefel-

säure berechnete Menge an Calciumkarbonat ein, bis die Kohlendioxydentwicklung aufhört und die Reaktion der Flüssigkeit gegen Kongorotpapier ganz und gegen Lackmuspapier möglichst neutral ist, preßt oder nutscht das ausgefallene Calciumsulfat ab und dampft die Flüssigkeit auf dem Wasserbade in einer Schale unter wirksamem Rühren mit der Turbine zum Sirup ab, indem man nicht unterläßt, in die Flüssigkeit etwas gefälltes Calciumkarbonat zu bringen, um das Vorhandensein oder Auftreten von Säuren auf alle Fälle unschädlich zu machen.

Man kann dies Abdampfen auch im Vakuum und in dem oben schon beschriebenen Apparate ausführen, hat aber dann oft mit der Schwierigkeit des sehr heftigen Schäumens solcher unreiner Flüssigkeiten zu tun, und sehr vorsichtiges Arbeiten sowie Zusatz von etwas Paraffin zu der Flüssigkeit sind häufig nicht imstande, ein Überschäumen zu verhüten.

Die zum Sirup gebrachten Flüssigkeiten werden nun, ganz wie es oben beschrieben ist, mit Alkohol von Gummi, Resten von Gips, Magnesiumsulfat aus unreinem Calciumkarbonat etc. befreit, im Vakuum wieder eingedampft, von neuem mit Alkohol und etwas Äther behandelt usw., um schließlich Kristalle zu liefern.

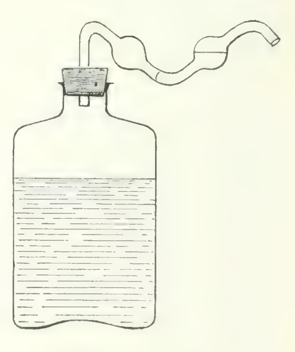


Fig. 7.

Wenn die betreffende Glykose nicht direkt kristallisiert, sondern in irgend einer schwer löslichen Form ausgefällt werden kann, so die Mannose als sehr schwer lösliches Phenylhydrazon, sind die umständlichen Alkoholreinigungsoperationen nicht nötig, und man kann die durch Hydrolyse der Steinnüsse mit Salzsäure erhaltene Flüssigkeit nach dem Neutralisieren mit Natriumhydroxyd oder Soda und dem Entfärben mit Blutkohle, direkt mit Phenylhydrazinacetat versetzen, um die Mannose als Phenylhydrazon zu erhalten (s. u.).

Zuweilen kann man die durch Hydrolyse gemengter Kohlenhydrate erhaltenen Flüssigkeiten durch Einbringung von Hefe verbessern; wenn nämlich der gewünschte Zucker nicht gärt, kann man durch die Wirkung der Hefe andere gärfähige Zucker zersetzen und entfernen.

So läßt sich die aus Kirschgummi gewonnene, neben Arabinose und Spuren Xylose auch die der Alkoholgärung fähige Galaktose enthaltende Flüssigkeit nach dem Sättigen mit Calciumkarbonat und dem Entfernen des Gipses durch Einbringen von etwas zerbröckelter guter Preßhefe leicht in Gärung versetzen. Man läßt diese in einer Flasche vorgehen, welche in ihrem Kautschukstöpsel ein Wasser enthaltendes Kugelrohr trägt (s. Fig. 7).

Nach 3 Tagen filtriert man, dampft ab usw. und erhält eine von Galaktose freie l-Arabinose. Mit gewöhnlicher Hefe, welche, wenn sie

auch frei von Stärke ist, doch häufig Milchsäureferment enthält, darf man nicht lange gären lassen, weil sonst auch die Arabinose sich bedeutend vermindert.

Einige Kohlehydrate, und speziell die Zellulose, werden nicht von erheblich verdünnter, wohl aber von fast konzentrierter Schwefelsäure angegriffen, und man befolgt, um z. B. Glukose aus Baumwolle zu gewinnen, am besten *Flechsigs*[1]) Verfahren, d. h. man vermischt die Baumwolle oder die sonstigen Cellulosearten mit zirka dem 3fachen Gewicht einer fast konzentrierten Schwefelsäure, und zwar entweder Schwefelsäure von 1·7 spez. Gew. oder (wie zur Bereitung von Pergamentpapier) ein Gemisch von 4 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Teil Wasser, oder auch von 5 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Teil Wasser.[2]) (*Flechsig* gab an: 50 *g* Baumwolle, 250 *g* konzentrierte reine Schwefelsäure, 84 *g* Wasser.)

Am folgenden Tage verdünnt man die dicke, dunkle Masse mit Wasser, so daß die Säure 5- oder 6%ig wird, und kocht die Flüssigkeit, am besten im Glyzerinbade, einige Stunden am Rückflußkühler und verfährt dann wie bei sonstigen Hydrolysen, indem man mit Baryum- oder Calciumkarbonat sättigt, eindampft, mit Alkohol etc. reinigt usw.

b) Einzeldarstellungs-Methoden.

In der folgenden Übersicht der Einzeldarstellungsmethoden können nur wenige der bekannteren oder häufiger vorkommenden Zuckerarten besprochen werden; in betreff der übrigen muß auf den vorhergegangenen allgemeinen Teil sowie auf die Bücher von *v. Lippmann*, *B. Tollens* und *Maquenne* verwiesen werden, und dies muß auch besonders in Hinsicht der von *E. Fischer* und seinen Mitarbeitern oder von anderen nach ähnlichen Methoden gewonnenen synthetischen Zuckerarten geschehen, weil die hierbei angewandten speziellen weitläufigen Methoden und ihre Beschreibung zu viel Raum einnehmen würden.

A. Monosaccharide oder Glykosen.[3])

1. Pentosen, $C_5H_{10}O_5$.

a) l-Arabinose oder l-Arabose.

Sie wird nach den von *R. W. Bauer*[4]) und von *Kiliani*[5]) gegebenen, etwas modifizierten Vorschriften aus Kirschgummi durch Hy-

[1]) *E. Flechsig*, Über Darstellung und chemische Natur des Cellulosezuckers. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **7**. S. 523 (1882/1883); s. a. *J. B. Lindsey* und *B. Tollens*, Über Dextrose aus „Sulfitcellulose" und aus Tannenholz. Annal. Chem. Bd. **267**. p. 370 (1892).

[2]) *E. W. Tromp de Haas* und *B. Tollens*, Untersuchung von Kokosnußschalen. Annal. Chem. Bd. **286**. p. 305 (1895).

[3]) Es ist am besten, die Monosaccharide, d. h. alle Zuckerarten mit geringerer Anzahl an Kohlenstoffatomen (C_3 bis C_9), welche sich hydrolytisch nicht weiter spalten lassen, mit dem allgemeinen Namen Glykosen zusammenzufassen und für den Traubenzucker oder die Dextrose, welche häufig Glykose genannt wird, nach *E. Fischers* Vorschlage den Namen Glukose zu reservieren.

[4]) *R. W. Bauer*, Journ. f. prakt. Chem. [2.] Bd. **34**. S. 47 (1886).

[5]) *Heinrich Kiliani*, Über Arabinose. Ber. d. D. chem. Ges. Jg. **19**. S. 3030 (1886).

drolyse in Schwefelsäure dargestellt. Ich lasse auf 1 *kg* grob gemahlenes Kirschgummi[1]) 7 *l* Wasser, welches 280 *g* konzentrierte Schwefelsäure, also nahe 4% H_2SO_4, enthält, 5 Stunden lang bei Wasserbadhitze im Porzellantopfe einwirken, indem ich zuerst in sehr gelinder Wärme das Gummi unter häufigem Rühren völlig zum Quellen bringe, so daß es sich nicht mehr zu Boden setzen kann. Die (immer nach Furfurol riechende) Hydrolysenflüssigkeit wird noch heiß in einer Schale mit 300—320 *g* gefälltem magnesiumfreien Calciumkarbonat gesättigt und durch Gießen durch einen Beutel und Auspressen des letzteren vom Gipsniederschlage befreit. Da Kirschgummi immer oder fast immer mit Salpetersäure Schleimsäure liefert und folglich Galaktosegruppen enthält und in ihm auch Glukosegruppen vorkommen können, so bringt man in die in einer Flasche mit Kautschukstöpsel und Gärrohr (s. S. 63) befindliche Flüssigkeit etwas gute Preßhefe, welche bald Schaumbildung und Gärung erregt, wobei das Kohlendioxyd durch das etwas Wasser enthaltende Gärrohr entweicht. Nach 3 oder höchstens 4 Tagen filtriert man und dampft im Wasserbade unter Umrühren zum Sirup ein. Mit Alkohol scheidet man mehrfach Gummisubstanzen ab, wie es im allgemeinen Teile beschrieben ist, dampft stets im Vakuum den Alkohol ab und erhält schließlich aus dem Sirup Kristalle, welche durch Absaugen von der Mutterlauge befreit und durch Umkristallisieren aus Wasser und Alkohol mit Blutkohle gereinigt werden. Die wieder konzentrierten, mit Alkohol möglichst von Gummistoffen befreiten Mutterlaugen liefern noch etwas Arabinose. Die letzten Muttersirupe streicht man nach dem Kristallinischwerden auf Ton. 1 *kg* Kirschgummi liefert meistens ca. 150 *g* reine Arabinose.

d-Arabinose, $C_5H_{10}O_5$.

Diese der l-Arabinose „antiloge" oder optisch isomere Substanz von gleicher Zusammensetzung und, bis auf die entgegengesetzte Richtung der Drehung des polarisierten Lichtes, gleichen Eigenschaften ist bis jetzt allein nicht mit Sicherheit, etwa im Harn, als solche gefunden, wohl aber kommt sie im Harn bei „Pentosurie" zugleich mit l-Arabinose und, wie *Neuberg* angibt, in razemischer Verbindung mit dieser, d. h. als r-Arabinose vor, welche wegen der gegenseitigen Kompensation von l- und d-Arabinose optisch inaktiv ist. In Auflösung, und so wohl auch im Harn, scheint die razemische Verbindung nicht beständig zu sein, und es werden statt ihrer die beiden Antilogen oder Antipoden vorhanden sein. Künstlich ist sie von *Wohl*[2]), *Ruff*[3]), *Neuberg*[4]) und *Wohlgemuth* aus

[1]) Von der Firma Ad. Abich Nachf. in Göttingen.

[2]) *A. Wohl*, Abbau des Traubenzuckers. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **26**. S. 730 (1893).

[3]) *Otto Ruff*, d- und r-Arabinose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 553 (1899).

[4]) *C. Neuberg* und *J. Wohlgemuth*, Über d-Arabinose, d-Arabonsäure und die quantitative Bestimmung der Arabinose. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35. S. 31 (1902).

Glukose durch Oxydation mittelst Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz oder aus Glukose durch Überführung in das Oxim und andere Stoffe, bis schließlich d-Arabinose entsteht, oder von *Guerbet*[1]) durch Kochen von gluconsaurem Mercurisalz dargestellt worden (s. die Lehrbücher).

Nachdem *Salkowski*[2]) und Andere das Vorkommen von Pentosen im Harn konstatiert hatten, erkannte *Neuberg*[3]) diese als r-Arabinose, und er stellte sie auf folgende Weise her.

20 *l* Pentoseharn wurden im Vakuum auf 1 *l* eingeengt und mit 6½ *l* Alkohol von 93%, wodurch Salze usw. gefällt wurden, versetzt. Das Filtrat sowie alkoholische Extrakte aus den Salzen wurden von Alkohol befreit, der mit Kohle möglichst entfärbte Rückstand wurde weiter mit Alkohol von Beimengungen befreit und schließlich wurde die Flüssigkeit mit 23 *g* Diphenylhydrazin erwärmt. Bald hatten sich Krusten und ein Brei von Nadeln aus Arabinose-Diphenylhydrazon abgeschieden, welche, abfiltriert, mit kaltem Alkohol gewaschen und dann getrocknet, 44·6 *g* reines Produkt lieferten, welches bei 206° schmolz und beim Erwärmen mit Formaldehyd und Pyridin die inaktive l-d- oder r-Arabinose lieferte.

Mit l-Menthylhydrazin läßt sich nach *Neuberg*[4]) die d-Arabinose aus den Lösungen der r-Arabinose fällen, während die l-Arabinose in Lösung bleibt.

2. **l-Xylose,** $C_5H_{10}O_5$.

Zu ihrer Darstellung benutzt man entweder Buchenholzgummi oder Weizenstroh.

a) Darstellung aus Buchenholzgummi.

Man übergießt nach *Wheeler* und *Tollens*[5]) 1 *kg* Buchenholzsägespäne mit einigen Litern 2%igen Ammoniaks, um Eiweißstoffe und sonstige Substanzen zu lösen, preßt nach 24 Stunden ab, wäscht mit Wasser, preßt wieder ab, wiederholt dies ein- oder zweimal, rührt die gereinigten Holzspäne mit 5%iger Natronlauge zum Brei an, läßt 24 Stunden in gelinder Wärme digerieren, preßt die alkalische Flüssigkeit ab und wieder-

[1]) *Marcel Guerbet,* Überführung der α-Oxysäuren in Aldehyde durch Kochen der wässerigen Lösung ihrer Mercurisalze; Anwendung zur Darstellung von l-Arabinose mit Hilfe von Mercuriglukonat. Bull. soc. chim. [4.] T. **3.** p. 427 (1908).

[2]) *E. Salkowski,* Über das Vorkommen von Pentosen im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **27.** S. 525 (1899).

[3]) *Carl Neuberg,* Über die Harnpentose, ein optisch inaktives, natürlich vorkommendes Kohlehydrat. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **33.** S. 2243 (1900).

[4]) *Carl Neuberg,* Über die Spaltung von racemischen Aldehyden und Ketonen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36.** S. 1194 (1903).

[5]) *H. J. Wheeler* und *B. Tollens,* Über die Xylose oder den Holzzucker, eine zweite Pentoglukose. Annal. Chem. Bd. **254.** p. 304 (1889). — *Friedrich Koch,* Experimentelle Prüfung des Holzgummis und dessen Verbreitung im Pflanzenreiche. Pharmazeut.-Ztg. f. Rußland. Bd. 25. S. 619 usw. Siehe auch Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **20.** Ref. S. 145 (1887).

holt das Digerieren mit weniger Natronlauge und Abpressen einmal. Die alkalischen Auszüge läßt man in einer Flasche sich klären, hebert vom Bodensatz ab und versetzt sie mit ihrem gleichen Volum starken Alkohols; das ausgefallene Natron haltende Holzgummi sammelt man auf einem Tuch, preßt es ganz schwach, rührt es mit Alkohol und so viel Salzsäure oder Essigsäure, daß die Reaktion sauer wird, an, preßt nach einiger Zeit wieder aus und wiederholt das Digerieren mit Alkohol, bis die Säure entfernt ist. Das so erhaltene Holzgummi oder Xylan (50—60 *g*) wird dann durch Hydrolyse in Xylose übergeführt. Man behandelt es entweder nach der für Arabinose gegebenen Vorschrift (s. d.) mit verdünnter Schwefelsäure oder man führt nach *Counclers*[1]) Vorgange die Hydrolyse mit Salzsäure aus, indem man z. B. 15·5229 *g* Holzgummi, 200 *cm*³ Wasser und 10 *cm*³ Salzsäure von 1·19 sp. Gew. gegen 3 Stunden im Wasserbade erhitzt. Die Flüssigkeit wird dann mit Bleikarbonat (reinem Bleiweiß) erwärmt, bis Kongorotpapier nicht mehr beim Betupfen verändert wird, bis also die Salzsäure gesättigt ist, dann wird filtriert, mit wenig Bleikarbonat versetzt, eingedunstet, mit Alkohol von noch fällbaren Stoffen befreit, dann, um Reste von Blei zu entfernen, mit Schwefelwasserstoff behandelt und bei Gegenwart von etwas Calciumkarbonat eingedunstet.

Schließlich kristallisiert die Xylose; sie wird wie die Arabinose gereinigt.

b) Darstellung aus Weizenstroh.

Nach *Bertrands*[2]) und *Héberts*[3]) Vorgange stellt man Xylose aus Weizenstroh dar.

C. Schulze und *B. Tollens*[4]) haben Weizenstrohhäcksel mit 2%igem Ammoniak und nachher Wasser von darin löslichen Stoffen befreit (siehe oben Holzgummi), dann die abgepreßte Masse mit 2- oder 3%iger Schwefelsäure 4 Stunden im Wasserbade gekocht, die Flüssigkeit abgepreßt, mit Calciumkarbonat gesättigt, vom Gips abgepreßt und im Vakuum eingedampft. Der durch mehrfaches Digerieren mit Alkohol möglichst vom Gummi befreite Sirup liefert schließlich 3—5% des Strohs an Xylose.

Aus einem alkalischen Strohextrakt kann man nach *Salkowski*[5]) mittelst *Fehling*scher Lösung Xylan ausfällen und dies hydrolytisch in Xylose überführen.

---

[1]) *C. Councler*, Verzuckerung von Holzgummi mittelst Salzsäure. Chem.-Ztg. Jg. **1892**. S. 1719.

[2]) *G. Bertrand*, Recherches sur quelques dérivés du xylose. Bull. Soc. chim. [3.] T. **5**. p. 555 (1891).

[3]) *Alexandre Hébert*, Sur une nouvelle méthode d'analyse de la paille. Compt. rend. T. **110**. p. 969 (1890).

[4]) *C. Schulze* und *B. Tollens*, Über die Xylose und ihre Drehungserscheinungen. Annal. Chem. Bd. **271**. p. 40 (1892).

[5]) *E. Salkowski*, Über die Darstellung des Xylans. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **34**. S. 162 (1901/2).

3. Anhang zu den Pentosen.
Glukuronsäure-Lakton oder Glukuron, $C_6H_8O_6$.

Die Glukuronsäure, $C_6H_{10}O_7$, kommt im Harn von Menschen und Tieren in Verbindung mit den verschiedensten Stoffen als „gepaarte Glukuronsäure" vor, in welchen glykosidartige Bindung der Glukuronsäure mit den anderen Stoffen anzunehmen ist.

Sie findet sich nach *P. Mayer* und *Neuberg*[1]), *C. Tollens*[2]), *Blumenthal*[3]) und anderen[4]) im normalen Menschenharn in geringer Menge, in größeren Mengen jedoch nach Eingabe von Chloral, Kampfer, Phenol, Kresol, Lysol usw.

Sie ist eins der Zwischenglieder zwischen Glukose, $C_6H_{12}O_6$, und Zuckersäure, $C_6H_{10}O_8$, und entsteht augenscheinlich im Organismus durch Oxydation. Sie wird sich dort mit den normal vorhandenen oder den eingeführten oben genannten Stoffen verbinden und dann im Harn ausscheiden.

Sie bildet als Anhydrid oder Lakton, $C_6H_8O_6$, im ganz reinen Zustande schöne große Sechsecke. Sie dreht rechts $(\alpha)D = +19{\cdot}4^0$. Die gepaarten Glukuronsäuren drehen links.

Zur Darstellung kann man nach *v. Mehring* und *Musculus*[5]) und nach *Külz*[6]) Chloralharn (welchen man von Hunden gewinnt) benutzen, welcher sie als Urochloralsäure, $C_8H_{11}Cl_3O_7$, enthält; ergiebiger aber und bequemer erhält man sie aus dem Purree, Piuri oder Indischgelb, einer als Malerfarbe bekannten Substanz, welche in Ostindien aus dem Harn von Kühen, welche mit Mangoblättern gefüttert werden, beim Erwärmen als Absatz ausscheidet und in anscheinend durch Abseihen in Tüchern, Ausdrücken und Trocknen gewonnenen Kugeln in den Handel gebracht werden.[7])

Das Piuri besteht der Hauptsache nach aus euxanthinsaurem Magnesium, $C_{19}H_{16}O_{11}Mg + 5H_2O$, und die Euxanthinsäure oder Euxanthinglukuron, $C_{19}H_{18}O_{11}$, zerfällt bei der Hydrolyse zu Euxanthon und Glukuronsäure, welche als Glukuronsäure-Lakton kristallisiert.

$$\underset{\text{Euxanthinsäure}}{C_{19}H_{18}O_{11}} = \underset{\text{Euxanthin}}{C_{13}H_8O_4} + \underset{\text{Glukuronsäure}}{C_6H_{10}O_7}$$

$$\underset{\text{Glukuronsäure}}{C_6H_{10}O_7} = \underset{\text{Glukuronsäurelakton}}{C_6H_8O_6} + H_2O$$

[1]) *P. Mayer* und *C. Neuberg*, Über den Nachweis gepaarter Glukuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 256 (1900).

[2]) *C. Tollens*, Der Nachweis von Glukuronsäure nach *B. Tollens* im menschlichen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **56**. S. 115 (1908).

[3]) *Ferdinand Blumenthal*, Biochemische Untersuchungen über Vergiftung und Entgiftung bei der Lysolvergiftung. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 135 (1906).

[4]) Siehe Zitate in der Abh. von *P. Mayer* und *C. Neuberg*.

[5]) *v. Mering* und *Musculus*, Über einen neuen Körper im Chloralharn. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **8**. S. 662 (1875).

[6]) *Külz*, Über Urochloralsäure und Urobutylchloralsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **14**. S. 2291 (1881).

[7]) *John Stenhouse*, Untersuchung einer gelben Substanz, welche unter dem Namen Purree von Indien kommt. Annal. Chem. Bd. **51**. p. 423 (1844). — *C. Gräbe*, Über die Euxanthongruppe. Annal. Chem. Bd. **254**. p. 265 (1889).

Zur Darstellung des Glukurons scheidet man zuerst mit Salzsäure die Euxanthinsäure ab und zerlegt diese dann durch Erhitzen mit Wasser oder mit schwacher Schwefelsäure auf 130°. Die vom abgeschiedenen Euxanthin abfiltrierte, von Schwefelsäure befreite Lösung gibt nach dem Abdampfen Kristalle von Glukuron.

Genauere Vorschriften zur Darstellung der Glukuronsäure haben *Thierfelder, Spiegel, P. Mayer*[1]), *Külz* (l. c.), *Mann* und *Tollens*[2]), *Neuberg*[3]), *Lefèvre* und *Tollens*[4]) gegeben.

Man benutzt die etwas Euxanthon enthaltende, aus dem Piuri durch Zerreiben mit Wasser und Salzsäure abgeschiedene, dann durch Abseihen, Auswaschen mit möglichst wenig Wasser und Pressen erhaltene rohe Euxanthinsäure, oder man reinigt diese erst durch Lösen in warmem Ammoniumkarbonat und Wiederfällen mit Schwefelsäure.

Man erhitzt sie nach *Neuberg* mit Schwefelsäure von 0·12% H_2SO_4 oder nach *Mann, Lefèvre* und *Tollens* mit 1%iger Schwefelsäure[5]) im Autoklaven 1 bis 1½ Stunden lang auf 130 bis höchstens 135°.

Da die Glukuronsäure ziemlich leicht zersetzlich ist, darf man zur Hydrolyse, wie *Lefèvre* und *Tollens* erfahren haben, nicht so starke Schwefelsäure anwenden, wie zur Hydrolyse mancher Kohlenhydrate erforderlich ist. Das Filtrat vom Euxanthon wird mit Baryumkarbonat von Schwefelsäure und mit Blutkohle möglichst vom Farbstoff etc. befreit; die Lösung liefert dann nach dem genauen Ausfällen von gelöstem Baryum mit Schwefelsäure (Tüpfelprobe auf einer Glasplatte mit einerseits Chlorbaryum und andererseits mit Schwefelsäure) und dem Eindampfen schöne Sechsecke von Glukuronsäurelakton.

Die Mutterlaugen liefern nach dem Reinigen mit Alkohol, wobei Gummi etc. beseitigt wird, noch mehr Kristalle, doch sind diese meistens schwer in großen Individuen zu gewinnen, und sie enthalten vielleicht noch andere Stoffe.

Vielleicht kann man zur Darstellung aus anderen Stoffen auch die Fällung mit p-Bromphenylhydrazin als Hydrazon oder Hydrazinsalz und die Zersetzung des letzteren mittelst Formaldehyd anwenden.[6])

---

[1]) *Paul Mayer,* Über die Phenylhydrazinverbindungen der Glukuronsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 62 (1900).

[2]) *F. Mann* und *B. Tollens,* Über die Bildung von Furfurol und Kohlensäure aus Glukuronsäure. Ann. Chem. Vol. **290**. p. 155 (1896).

[3]) *Carl Neuberg,* Zur Kenntnis der Glukuronsäure. I. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **33**. S. 3317 (1900).

[4]) *K. U. Lefèvre* und *B. Tollens,* Untersuchungen über die Glukuronsäure, ihre quantitative Bestimmung und ihre Farbenreaktionen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 4513 (1907).

[5]) Nicht mit 10%iger Schwefelsäure, wie a. a. O. durch einen Druckfehler angegeben ist.

[6]) *Carl Neuberg,* Über eine Verbindung der Glukuronsäure mit p-Bromphenylhydrazin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 2395 (1899).

4. Methylpentosen, $C_6H_{12}O_5$.

α) **Rhamnose,** $C_6H_{12}O_5 + H_2O$. Isodulcit, Rhamnodulcit.

Diese schön kristallisierte, in sehr vielen Glykosiden, wie Rutin, Frangulin etc., ferner im Solanin und besonders in dem Farbstoff der Gelbbeeren und des Quercitron aus der Färbereiche, d. h. dem Quercitrin oder Xanthorhamnin enthaltene Methylpentose wird durch Hydrolyse der genannten Stoffe mittelst verdünnter Schwefelsäure erhalten.[1] Man filtriert von den in Wasser unlöslichen Spaltungsprodukten der Glykoside ab, reinigt die Flüssigkeiten mit Kohle, verdampft und die leichte und gute Kristallisationsfähigkeit dieser Zuckerart ist hierbei von Vorteil. *Liebermann* und *Hörmann* wandten zur Zerlegung des Xanthorhamnins nahezu 4%ige Schwefelsäure und zweistündiges Erhitzen im Wasserbade an.

Die Rhamnose wird auch im Großbetriebe als Nebenprodukt bei der Herstellung von Farbstoffen gewonnen (Anilinfarben- und Extraktfabriken, vormals Joh. Rud. Geigy in Basel).

β) **Fukose,** $C_6H_{12}O_5$.

Die Fukose[2]) stellt man aus Seetang (Fucus vesiculosus, nododus etc.) her. Getrockneter Seetang wird durch Extrahieren mit 2%iger Schwefelsäure, Auswaschen und Pressen von löslichen Stoffen befreit und dann mit der sechsfachen Menge von 5%iger Schwefelsäure (je 1 *l* hält 50 *g* konzentrierter Schwefelsäure) 8 Stunden im Wasserbade erhitzt. Dann wird abgepreßt, mit Calciumkarbonat gesättigt, vom Gips abgepreßt, eingedampft.[3])

Der Sirup wird dann mit Alkohol mehrfach vom Gummi befreit[4]), und, da er, selbst nach dem Impfen mit Fukose, nie Kristalle liefert[5]), wird er mit gleichen Teilen Wasser und zirka seinem halben Gewicht Phenylhydrazin versetzt. Das nach 24 Stunden abgeschiedene Fukose-Phenylhydrazon, $C_6H_{12}O_4 : N . NH . C_6H_5$, wird auf einer großen mit Papier bedeckten Porzellannutsche abgesogen, und die Mutterlauge wird

---

[1]) Siehe z. B. *C. Liebermann* und *P. Hörmann*, Über das Glukosid der Gelbbeeren und den Rhamnodulcit; *C. Liebermann* und *S. Hamburger*, Über die Formel des Quercitrins und des Quercetins; *C. Liebermann*, Über einige früher beschriebene Derivate des Quercetins; *C. Liebermann* und *O. Hörmann*, Über die Farbstoffe und den Glukosidzucker der Gelbbeeren. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **11**. S. 952, 955 (1878); Jg. **12**. S. 1178 (1879); Jg. **17**. S. 1680 (1884); Ann. Chem. Vol. **196**. p. 299 (1879).

[2]) *A. Günther* und *B. Tollens*, Über die Fukose, einen der Rhamnose isomeren Zucker aus dem Seetang. Ann. Chem. Vol. **271**. p. 86; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. S. 1753, 2585 (1890).

[3]) *K. Bieler* und *C. Tollens*, Über das „Fukusol" genannte Gemenge von Furfurol und Methylfurfurol. Ann. Chem. Vol. **258**. p. 127 (1890).

[4]) *A. Müther* und *B. Tollens*, Über die Produkte der Hydrolyse von Seetang (Fucus), Laminaria und Carragheenmoos. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **37**. S. 298 (1904).

[5]) *Willy Mayer* und *B. Tollens*, Untersuchungen über die Fukose und über die Bestimmung der Methylpentosane. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 2434 (1907); Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zucker-Ind. Jg. **1907**. S. 621.

darauf geprüft, ob sie auf Zusatz von Phenylhydrazin weitere Ausscheidung gibt.

Das Hydrazon wird aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, bis der Schmelzpunkt 170—171° ist, und dann nach *Herzfelds* Verfahren mit Benzaldehyd zersetzt, indem z. B. 50 *g* Fukose-Phenylhydrazon, 50 *g* Benzaldehyd, 50 *g* Alkohol, 40 *g* Wasser am Rückflußkühler im Wasserbade $^1/_2$ Stunde bis 1 Stunde erhitzt werden.

Nach völligem Erkalten saugt man die Flüssigkeit vom Benzaldehyd-Phenylhydrazon ab, schüttelt sie mit Äther zwei Mal aus, erwärmt sie mit Blutkohle und dunstet ein.

Der Sirup kristallisiert nach dem Impfen sehr bald, und Absaugen auf Ton sowie eventuelles Umkristallisieren vollenden die Reinigung. 1 *kg* Seetang liefert 3—8 *g* Fukose.

Die Fukose dreht stark links $(\alpha)D = -75-76°$ und besitzt Mehrdrehung (s. *Günther* und *Tollens* l. c., *Tollens* und *Rorive* [1]).

γ) **Rhodeose,** $C_6H_{12}O_5$.

Diese Methylpentose ist die optisch entgegengesetzte Modifikation oder das Antilogon der Fukose. Sie ist von *Votoček* [2]) u. a. aus dem Convolvulin, dem Glykoside der Jalappenwurzel, hergestellt und darauf genau untersucht. Als zweites Beispiel der Darstellung der Zuckerart aus dem sie enthaltenden Glykoside möge ihre Darstellung hier beschrieben werden.

Votoček [3]) löst 50 *g* Convolvulin in 375° Barytwasser, fällt durch Zusatz von Schwefelsäure die beigemengte Convolvulinsäure aus, filtriert und erhitzt das Filtrat mit $^1/_2$%iger Schwefelsäure 40 Stunden auf 100°. Dann filtriert er, neutralisiert mit Bariumkarbonat und reinigt das Filtrat durch Zusatz von Bleiessig und Einleiten von Schwefelwasserstoff; das Filtrat hiervon liefert beim Verdunsten einen Sirup, welcher auf 2 Teile Rhodeose 1 Teil Glukose enthält. Die letztere kann man durch Hefezusatz, also durch Gärung zerstören.

Aus der durch Verdunsten wieder konzentrierten Rhodeoselösung fällt man die Rhodeose durch Zusatz von Methyl-Phenylhydrazin, man zerlegt das Hydrazon dann durch wiederholtes Erwärmen mit Benzaldehyd und läßt die verdunstete wässerige Lösung kristallisieren.

Die Rhodeose dreht stark rechts, $(\alpha)D = +75-77°$.

5. Hexosen, $C_6H_{12}O_6$.

α) **d-Glukose,** Dextrose, Traubenzucker, Harnzucker, Stärkezucker. Anhydrid, $C_6H_{12}O_6$. Hydrat, $C_6H_{12}O_6 + H_2O$.

---

[1]) *Tollens* und *Rorive*, Über die Fukose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **42**. S. 2009 (1909).

[2]) *Votoček* in *v. Lippmanns* Chemie der Zuckerarten. S. 193 (1904). Verschiedene Berichte der Versuchsstation für Zuckerindustrie in Prag.

[3]) *F. Salomon*, Die Stärke und ihre Verwandlungen unter dem Einfluß anorganischer und organischer Säuren. Journ. f. prakt. Chem. (2). Bd. 28. S. 82 (1883).

Die gewöhnliche oder d-Glukose wird aus Stärke in großem Maßstabe durch Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure mit oder ohne Druck dargestellt, und hierüber möge man die betreffenden Lehr- und Handbücher nachlesen.

Siehe auch *Salomon*[1]) und *Tollens.*[2])

Handelt es sich darum, käuflichen rohen Stärkezucker zu reinigen, so wählt man sich eine möglichst gut kristallinische Sorte, schmilzt diese unter vorsichtigem Erwärmen in $^{1}/_{4}$ ihres Gewichtes Wasser, setzt der heißen Flüssigkeit ihr doppeltes Volum an starkem Alkohol zu, erwärmt mit Blutkohle in einer Flasche am Rückflußkühler, filtriert durch den Heißwassertrichter, bringt nach dem Erkalten etwas Glukose-Anhydrid ein und läßt an einem mäßig warmen Orte unter häufigem Umrühren einige Tage stehen.

Der ausgeschiedene Zucker (meistens Anhydrid, zuweilen auch Hydrat) wird dann abgesogen, mit etwas Alkohol, dann Äther nachgewaschen und an der Luft getrocknet. Man kann mit Vorteil auch Methylalkohol zum Umkristallisieren verwenden *(Soxhlet)*.

Hat man das Hydrat und wünscht hieraus durch Trocknen Anhydrid zu erhalten, so darf man nur sehr langsam das Hydrat erhitzen (etwa in dünner Schicht in einem Wassertrockenschrank, der erst im Laufe einiger Stunden von der gewöhnlichen Temperatur auf 60° kommt), denn sonst schmilzt oder sintert das Hydrat und verliert das Wasser nur unvollständig und bräunt sich später.

Ist das Wasser fast fortgetrieben, kann man den Zucker ohne Schaden auf 90—100° kommen lassen.

Kleinere Mengen Glukose kann man aus Rohrzucker, welcher mit starken Säuren in Berührung in Glukose und Fruktose zerfällt, nach dem Vorgange z. B. von *Schwarz, Müller, Otto* und neuerdings *Soxhlet*[9]) darstellen.

Nach *Soxhlet*[8]) rührt man in eine Mischung von 12 *l* Alkohol von 90° Tr. mit 480 cm^3 Salzsäure von 1·19 spezifischem Gewicht bei 45° allmählich 4 *kg* Rohrzuckerpulver ein.

Nach einigen Stunden ist der Zucker gelöst und in Invertzucker verwandelt. Man läßt erkalten und rührt etwas reine Glukose ein, wodurch die Kristallisation angeregt wird. Nach 1—2 Tagen ist viel Glukose ausgeschieden; sie wird abgesogen, mit starkem und zuletzt absolutem Alkohol abgewaschen und darauf aus starkem Alkohol *(Müller, Otto)* oder aus Methylalkohol *(Soxhlet)* umkristallisiert.

Auch aus im Handel vorkommendem eingedickten Weinmost, welcher allmählich kristallisiert, kann man reine Glukose gewinnen, indem man die dick gewordene Masse auf Ton abtrocknen läßt und sie dann umkristallisiert.

[1]) *B. Tollens,* Über das Verhalten der Stärke bei der Hydrolyse mit ziemlich konzentrierter Schwefelsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **39**. S. 2190 (1906).

[2]) *F. Soxhlet,* Das Verhalten der Zuckerarten zu alkalischen Kupfer- und Quecksilberlösungen. Journ. f. prakt. Chem. (2). Bd. **21**. S. 242, 245 (1880).

Die Darstellung von Glukose aus diabetischem Harn gelingt leicht, wenn der Harn vier oder mehr Prozent Glukose enthält. Man dampft zum dünnen Sirup ab, erwärmt diesen mit starkem Alkohol, welcher Salze und amorphe Substanzen hinterläßt, dampft wieder ab, läßt kristallisieren, extrahiert aus der abgesogenen Masse mit starkem kalten Alkohol den Harnstoff und reinigt die Masse durch Umkristallisieren, und zwar wohl auch, nachdem man mit etwas Bleiessig Beimengungen beseitigt und das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt hat. Wenig Glukose haltender diabetischer Harn eignet sich nicht gut zur Glukosedarstellung, weil das nie fehlende Kochsalz leicht mit der Glukose in Verbindung auskristallisiert und die Trennung beider Stoffe schwierig ist.

Reaktion der Acetylierung. *Liebermanns* Acetatreaktion.

Hauptsächlich zum Zweck der Darstellung von Acetaten, jedoch wohl auch zu analytischen Zwecken, um z. B. die betreffenden Stoffe durch die Eigenschaften ihrer Acetate zu identifizieren, wird bei allen Zuckerarten die *Liebermann*sche Methode der Acetylierung angewandt.

Wenn man Kohlenhydrate mit Essigsäureanhydrid erhitzt, tritt teilweise Bildung von Acetat des Kohlenhydrats ein, dies wird durch Zusatz anderer (als Katalysatoren zu betrachtenden) Stoffe sehr beschleunigt.

Am besten eignet sich nach *Liebermann* [1]) und *Hörmann* sowie *Herzfeld* [2]) bei den Zuckerarten hierzu das entwässerte Natriumacetat; man kann statt dessen oder auch mit demselben zugleich auch ein Stückchen wasserfreies Chlorzink oder nach *Franchimont* [3]) einen Tropfen konzentrierte Schwefelsäure nehmen.

Es bilden sich auf diese Weise Acetate mit so viel Essigsäuregruppen, wie möglich ist, indem in jedes Hydroxyl des Zuckers 1 Molekül Acetyl statt des Wasserstoffes eintritt.

Glukose gibt auf diese Weise das Pentacetat, in dem entweder der Wasserstoff des Karbonyls untätig bleibt, oder die Konstitution des Acetats eine andere als diejenige der Glukose ist. [4])

Je nach der Art des Operierens können sich verschiedene Modifikationen der Acetate bilden, so bei Glukose das bei 130° schmelzende α-Penta-

---

[1]) *C. Liebermann* und *O. Hörmann*, Über die Formeln des Rhamnetins und Xanthorhamnins. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **11**. S. 1618 (1878).

[2]) *A. Herzfeld*, Acetylierung einiger Kohlehydrate nach dem *Liebermann*schen Verfahren. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **13**. S. 265 (1880).

[3]) *A. P. N. Franchimont*, Über die Acetylderivate der Cellulose. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **14**. S. 1290 (1881).

[4]) Siehe z. B. *A. P. N. Franchimont*, Über Kohlehydrate und über die Pentaacetate der Glukose. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **12**. S. 1940 (1879); Jg. **25**. Ref. S. 911 (1892); *Wilhelm Königs* und *Eduard Knorr*, Über einige Derivate des Traubenzuckers und der Galaktose. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **34**. S. 974 (1901); *C. Tanret*, Sur les éthers acétiques de quelques sucres. Bull. Soc. chim. [3]. T. **13**. p. 268 (1895).

acetat [1], $(\alpha) D = + 3{\cdot}66^0$, das bei 86^0 schmelzende β-Pentaacetat, $(\alpha) D = + 59^0$, und das bei 111^0 schmelzende γ-Pentaacetat, $(\alpha) D = + 101{\cdot}75^0$, welche zum Teil ineinander umgewandelt werden können und auf diese Weise besonders die γ-Modifikation entstehen lassen.

Zur Gewinnung des α-Glukose-Pentaacetats gibt *Tanret* folgende Vorschrift:

3 *g* Glukose-Anhydrid,
1·5 *g* Natriumacetat (wasserfrei),
12 *g* Essigsäure-Anhydrid

werden in einem Fläschchen am Rückflußkühler auf etwas über 100^0 und bis die Reaktion beginnt, und dann noch ca. $^1/_2$ Stunde gelinde erhitzt. Dann läßt man erkalten, setzt Wasser dazu und zerreibt die Masse unter Zusatz von Soda bis zur Sättigung. Das gefällte und mit Wasser gewaschene Glukoseacetat wird getrocknet und aus Alkohol von 95^0 Tr. umkristallisiert, bis Schmelzpunkt und spezifische Drehung sich nicht mehr ändern.

β) **Mannose,** Seminose, $C_6 H_{12} O_6$.

Die Mannose findet sich vielfach in harten Samen, wie Datteln, Kaffeebohnen etc. Als Material zu ihrer Darstellung dienen am besten die Späne, welche beim Drehen von Knöpfen aus den Steinnüssen, den harten Samen von Phytelephas- und Coelococcusarten, abfallen.

Nach der bewährten Vorschrift von *E. Fischer* und *Hirschberger* [2]) erhitzt man 1 Teil Steinnußspäne mit 2 Teilen $6^0/_0$iger Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·03) in einer Flasche mit Rückflußrohr 6 Stunden lang im siedenden Wasserbade, nutscht dann ab, wäscht den Rückstand mit etwas Wasser nach, neutralisiert die gesammelte Flüssigkeit mit Natriumkarbonat oder Natronlauge, erwärmt mit Blutkohle, filtriert und versetzt mit gegen $30^0/_0$ der Steinnüsse an mit Essigsäure gesättigtem Phenylhydrazin.

Bald scheidet sich eine dicke Masse von Mannose-Phenylhydrazon ab, welche am folgenden Tage abgesogen, gewaschen und getrocknet wird. Man kann das Hydrazon aus $50^0/_0$igem Alkohol (mit etwas Pyridin) umkristallisieren, doch kann man auch aus dem rohen Hydrazon Mannose darstellen und das schwierige Umkristallisieren des schwer löslichen Hydrazons vermeiden.

Man erwärmt (siehe Fukose) 50 *g* des Hydrazons, 40 *g* Benzaldehyd [3]), 50 *g* Alkohol und 50 *g* Wasser im Kolben am Rückflußkühler im Wasserbade ca. $^1/_2$ Stunde lang. Sobald sich die ganze Masse in das fein kristallinische Benzaldehyd-Phenylhydrazon umgewandelt hat, läßt man er-

[1]) Diese Zahlen befinden sich in *Tanrets* Abhandlung, im Buch von *v. Lippmann* sind die Modifikationen anders bezeichnet.

[2]) *Emil Fischer* und *Josef Hirschberger*, Über Mannose IV. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. 22. S. 3218 (1889).

[3]) Siehe *Dugrené de Witt* und *Herzfeld*, Verfahren zur Darstellung von Mannose. Zeitschr. d. Ver. d. Deutsch. Zuckerindustrie. Jg. 1895. II. S. 794.

kalten, saugt die Flüssigkeit ab, schüttelt sie mit Äther aus, entfärbt sie mit Blutkohle, verdunstet usw., wie es bei Fukose angegeben ist.

Der wenig gefärbte Sirup kristallisiert kaum von selbst, wohl aber nach dem Impfen mit etwas nach dem Verfahren von *van Ekenstein* [1]) hergestellter kristallisierter Mannose.

Solche kristallisierte Mannose hat *van Ekenstein* [1]) erhalten, indem er Mannosesirup in Methylalkohol löste, ein halbes Volum Äther hinzugab, am folgenden Tage vom ausgeschiedenen Sirup abgoß und die ätherisch-methylalkoholische Lösung längere Zeit stehen ließ. Auch *Herzfeld* und *Rose* [2]) haben sie erhalten, ebenfalls *Neuberg* und *Mayer* [3]), und auch mir ist es gelungen. Man bringt den schließlich erhaltenen Brei auf Ton und kristallisiert die schon fast reine Mannose um.

Nach *Bourquelot* und *Hérissey* [4]) erhält man Mannose vorteilhaft aus den Samen der Palme Phoenix canariense, nach *Hérissey* [5]) u. a. aus Johannisbrotsamen sowohl durch Säuren als auch durch die in den Samen enthaltenen Enzyme.

γ) **d-Galaktose,** $C_6H_{12}O_6$.

(Früher wurde sie häufig Laktose genannt, jetzt versteht man unter „Laktose" den Milchzucker.)

Man erhält sie durch Hydrolyse des Milchzuckers, welcher zu Glukose und Galaktose zerfällt:

$$\underset{\text{Milchzucker}}{C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O} = \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Galaktose.}}{C_6H_{12}O_6}$$

Die Hydrolyse geschieht meistens mit Schwefelsäure, und nach *Ost* [6]) erhitzt man 1 Teil Milchzucker mit 10 Teilen 2%iger Schwefelsäure 4 Stunden im kochenden Wasserbade, worauf sich nach dem Impfen in einigen Tagen ein Teil der entstandenen Galaktose in Krusten abscheidet. Nach *Soxhlet* [7]), *Rindell* [8]), *Kent* und *Tollens* [9]) und Anderen entfernt man nach der Hydrolyse erst die Schwefelsäure mit Calcium- oder Baryum-

---

[1]) *van Ekenstein*, Rec. d. trav. d. Pays-Bas. T. **14**. pag. 329 (1896).

[2]) *Herzfeld* und *Rose*, s. *v. Lippmann*, Die Chemie der Zuckerarten. S. 651 (1904).

[3]) *C. Neuberg* und *P. Mayer*, Über kristallisierte d-Mannose. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 545 (1903).

[4]) *Em. Bourquelot* und *H. Hérissey*, Sur la composition de l'albumen de la graine de Phoenix canariensis et sur les phénomènes chimiques qui accompagnent la germination de cette graine. Compt rend. T. **133**. p. 302 (1901).

[5]) *H. Hérissey*, Influence du flourure de sodium sur la saccharification par la séminase des hydrates de carbone contenus dans les albumens cornés des graines de légumineuses. Compt. rend. T. **133**. p. 49 (1901).

[6]) *H. Ost*, Die Bestimmung der Zuckerarten mit Kupferkaliumkarbonatlösung II. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **23**. S. 3006 (1890).

[7]) *F. Soxhlet*, Das Verhalten der Zuckerarten zu alkalischen Kupfer- und Quecksilberlösungen. Journ. f. prakt. Chem. (2). Bd. **21**. S. 269 (1880).

[8]) *Scheiblers* neue Zeitschr. f. Rübenzuckerindustrie. Bd. **4**. S. 163.

[9]) *W. H. Kent* und *B. Tollens*, Untersuchungen über Milchzucker und Galaktose. Ann. Chem. Vol. **227**. p. 224 (1885).

karbonat, dampft ein und impft mit etwas Galaktose. Die allmählich abgeschiedenen Kristalle werden abgepreßt und umkristallisiert, indem man sie mit wenig Wasser schmilzt und dann diese Lösung mit Alkohol vermischt. Die Galaktose kristallisiert leichter und schneller als die meisten anderen Glykosen.

Auch durch Kochen von Milchzucker mit schwacher Salzsäure, bis sich die spezifische Drehung nicht mehr ändert, und Verdunsten der Lösung auf dem Wasserbade im Vakuum läßt sich ein nach Impfung mit Galaktose kristallisierender Sirup und durch Umkristallisieren reine Galaktose gewinnen.

δ) **d-Fruktose,** Lävulose, Fruchtzucker, $C_6H_{12}O_6$.

Diese Ketohexose erhält man leicht aus dem Inulin der Dahlien- oder Georginenknollen durch Hydrolyse mit sehr verdünnter Schwefel- oder Salzsäure, wobei man bedenken muß, daß die Fruktose sehr leicht durch Säuren zersetzt wird, und man daher nur kurze Zeit erhitzen darf.

Nach *Hönig* und *Jesser*[1]) erhitzt man 1 Teil Inulin mit 5 Teilen einer $^1/_2$%igen Schwefelsäure höchstens 1 Stunde lang im Wasserbade, entfernt die Schwefelsäure mit Baryumkarbonat, dunstet das Filtrat ein, erwärmt den Sirup mit starkem Alkohol, gießt die erkaltete Flüssigkeit nach einigem Stehen vom abgeschiedenen Sirup ab und impft mit kristallisierter Fruktose.

Ost[2]) erhitzt 100 *g* Inulin mit 250 *g* Wasser und $^1/_2$ *g* Salzsäure $^1/_2$ Stunde im Wasserbade, neutralisiert mit $^1/_2$ *g* Mono-Natriumkarbonat, dunstet ein, extrahiert mit absolutem Alkohol, gießt nachher vom Sirup ab, impft usw.

Um aus Gemengen anderer Zuckerarten mit Fruktose die letztere zu gewinnen, benutzt man die Eigenschaft der Fruktose, mit Kalk eine schwer lösliche Verbindung zu liefern. Man befolgt zur Darstellung von Fruktose aus Invertzucker, d. h. dem Gemenge von Glukose und Fruktose, welches aus Rohrzucker entsteht (s. unten), am besten die alte Vorschrift von *Dubrunfaut*[3]), welche *Girard*[4]) etwas vervollständigt hat.

In eine Lösung von 10 *g* Invertzucker in 100 cm^3 Wasser, welche in Eiswasser gekühlt ist, rührt man 6 *g* Kalkhydratpulver. Dies löst sich bald auf, und allmählich erstarrt die kalt gehaltene Masse zu einem kristallinischen Brei von Calciumfructosat, $C_6H_{12}O_6 . Ca(OH)_2$, mit, je nach den Autoren (*Peligot* sowie *Herzfeld* und *Winter*), 2—5 oder mehr Molekülen H_2O.

Man preßt dies aus, rührt mit Wasser an und preßt wieder aus, oder man schleudert die Flüssigkeiten in einer Zentrifuge fort, sättigt die wieder mit Wasser zerrührte Masse mit Kohlensäure, Oxalsäure oder Schwefelsäure, saugt ab und verdunstet die Flüssigkeit zum Sirup, aus welchem man die kristallinische Fruktose gewinnen kann.

---

[1]) *M. Hönig* und *L. Jesser*, Zur Kenntnis der Kohlehydrate. Ber. d. Wiener Akad. Bd. 97 II. S. 534.

[2]) *H. Ost*, Die Bestimmung der Zuckerarten mit Kupferkaliumkarbonatlösung II. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 23. S. 3006 (1890).

[3]) *M. Dubrunfaut*, Note sur le sucre interverti. Compt. rend. T. 42. p. 901 (1856).

[4]) *Charles Girard*, Préparation de la lévulose pure. Bulletin Soc. chim. [2.] T. 33. p. 154.

Im großen Maßstabe wird Fruktose von Scherings Fabrik aus Melasse durch Inversion des darin enthaltenen Rohrzuckers und nachfolgender Fällung mit Kalk hergestellt.[1])

Sorbose, Sorbinose (früher Sorbin genannt), $C_6H_{12}O_6$.

Als Beispiel eines Zuckers, welcher anscheinend nicht als solcher in der Natur vorkommt, wohl aber leicht durch oxydierende Pilztätigkeit entsteht, möge die Sorbose kurz genannt werden.

Sie entsteht beim längeren Stehen des Saftes der Vogelbeeren (Sorbus Aucuparia) aus dem entsprechenden 6wertigen Alkohol, dem Sorbit, $C_6H_{14}O_6$, indem sich der Pilz Bacterium xylinum ansiedelt und durch Übertragung von 1 Atom Sauerstoff 2 H aus dem Sorbit, $C_6H_{14}O_6$, entfernt. Von *Pelouze, Delffs, Vincent, Freund* ist sie früher untersucht, und *Bertrand*[2]) hat die Art ihrer Entstehung klargestellt.

Sorbit ist (wie die Fruktose) eine Ketose, d. h. sie enthält nicht die Endgruppe COH, sondern eine mittelständige Gruppe CO.

Die Sorbose ist linksdrehend, $(\alpha) D = -43^{\circ}$, und ihre Eigenschaften sind denjenigen der Fruktose in manchem ähnlich, so gibt sie mit Resorzin und Salzsäure dieselbe Rotfärbung.

Wie *Bertrand*[2]) fand, werden auch andere Alkohole der Zuckergruppe durch das Bacterium xylinum zu den betreffenden 2 H weniger enthaltenden Ketosen oxydiert.

Zur Bereitung von Sorbose impft man mit Bacterium xylinum *a)* eine einige Prozente Sorbit enthaltende Lösung von 0·1 *g* KH_2PO_4, 0·1 *g* $Na_2HPO_4 + 12 H_2O$, 0·1 *g* $CaCl_2$, 0·06 *g* $MgSO_4 + 7 H_2O$ in einem Liter oder *b)* Vogelbeer- oder Kirschsaft, welchen man erst hat gären lassen und darauf, mit dem halben Volum Wasser verdünnt, durch kurzes Aufkochen sterilisiert hat. Man hält die Flüssigkeiten in Gefäßen mit großer Oberfläche bei 25° C, dampft, sobald die Reduktionskraft nicht mehr zunimmt, das mit Bleiessig etc. gereinigte Liquidum ein usw.

6. Erster Anhang zu Fruktose und Glukose.

Invertzucker.

Dies Gemenge gleicher Moleküle Glukose und Fruktose wird aus Rohrzucker durch Hydrolyse mit Säuren (oder auch Fermenten, wie Invertase) dargestellt:

$$\underset{\text{Rohrzucker}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + H_2O = \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Fruktose.}}{C_6H_{12}O_6}$$

[1]) Chemische Fabrik auf Aktien (vorm. *E. Schering*) Berlin. Verfahren zur Verwertung von Melasse durch Verarbeitung auf Lävulose. D. R. P. 67.087 vom 19. Juni 1897. Kl. 89 und Verfahren zur fabriksmäßigen Darstellung von reiner Lävulose. D. R. P. 76.627 vom 8. April 1892. Kl. 89. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **26**. Ref. S. 427 (1893); Bd. 28. Ref. 46 (1895).

[2]) *Bertrand*, Préparation biochimique du sorbose. Bull. Soc. chim. (3). T. 15. S. 627 (1896).

Man muß hierbei die leichte Zersetzlichkeit der Fruktose bedenken.

Nach früheren Vorschriften erwärmt man Rohrzucker mit dem 5- bis 10fachen Gewicht an Wasser und 1 bis 2% des Zuckers an Schwefelsäure, Salzsäure, Weinsäure, Oxalsäure etc., entfernt die Säuren durch Fällungsmittel und dampft ein.

Nach *Wohl* und *Kollrep*[1]) kann die Quantität sowohl des Wassers als auch der Säure sehr vermindert werden. Man bringt nach ihnen den Rohrzucker mit nur $^1/_4$ seines Gewichts Wasser bei ca. 90° zur Lösung, setzt 1- bis 2hundertstel Prozent des Rohrzuckers an konzentrierter Salzsäure, welche mit Wasser verdünnt war, hinzu, erwärmt, bis Inversion eingetreten ist, was ungefähr 1 Stunde dauert, im Wasserbade auf 95° C und bringt zur Sättigung der Salzsäure eine kleine Menge Natriumkarbonat hinzu.

So erhält man einen zu 80% aus Invertzucker bestehenden Sirup, aus welchem allmählich Glukose kristallisiert.

Über die Darstellung von Invertzucker zu analytischen Zwecken sehe man bei der quantitativen Bestimmung des Rohrzuckers nach.

Zweiter Anhang:

Inosit, $C_6H_{12}O_6$.

Von dieser Substanz, welche zwar wie die Hexosen zusammengesetzt ist, aber nicht deren Konstitution, sondern eine zyklische besitzt und in verschiedenen rechts- und linksdrehenden Modifikationen vorkommt, ist die inaktive nicht drehende Modifikation am wichtigsten, weil sie häufig im Pflanzenreich, ferner im Saft des Fleisches und auch im menschlichen Harn vorkommt.

Zur Darstellung benutzt man die Eigenschaft des Inosit, durch Bleiessig mit Ammoniak gefällt zu werden. Man sucht, aus den Flüssigkeiten oder Auszügen zuerst durch Bleizucker oder durch Kalk (*Maquenne*[2]) andere Stoffe möglichst zu fällen und zu entfernen, setzt den Filtraten dann Bleiessig und Ammoniak hinzu, sammelt und wäscht den Niederschlag, suspendiert ihn in Wasser, zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff, verdunstet das Filtrat und sucht durch Behandeln des Sirups mit Alkohol und Äther Gummistoffe etc. zu beseitigen. Beim Vorhandensein größerer Mengen an Inosit scheiden sich bald Kristalle ab; so beim Verarbeiten von grünen Schneidebohnen (*Vohl*[3]), Walnußblättern (*Maquenne*[4]) und

[1]) *A. Wohl*, Zur Kenntnis der Kohlehydrate I; *A. Wohl* und *A. Kollrep*, Berlin. Verfahren zur Darstellung von Invertzucker. D. R. P. 62.933 vom 5. September 1890. — Zusatz zum Patent 57.368 vom 11. Juli 1889. Kl. 89. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. S. 2086 (1890); Jg. **25**. Ref. S. 710 (1892).

[2]) *M. Maquenne*, Préparation, propriétés et constitution de l'inosite. Bull. Soc. chim. [2.] T. 47. p. 290 (1887).

[3]) *H. Vohl*, Phaseomannit, eine neue Zuckerart, enthalten in den unreifen Früchten von Phaseolus vulgaris. Ann. Chem. Pharm. Bd. 99. S. 125 (1856).

[4]) *M. Maquenne*, Préparation, propriétés et constitution de l'inosite. Bull. Soc. chim. [2.] T. 47. p. 290 (1887).

manchen der vielen von *Marmé*[1]), von *Kobert* und *Fick*[2]) und Anderen untersuchten Pflanzen.

Nach *Maquenne* und neuerdings auch *Rosenberger*[3]) wendet man zur Reinigung der inosithaltenden Sirupe mit Vorteil konzentrierte Salpetersäure an, welche die Beimengungen leichter zerstört als den Inosit. Man vermischt den heißen Sirup mit 5 bis 7% seines Gewichts an konzentrierter Salpetersäure (*Rosenberger* schreibt: „Soviel konzentrierte Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1·5), daß ihr Gehalt 2·5 Volumprozent freier Säure entspricht.“), welche heftiges Aufschäumen verursacht.

Nachher sättigt man mit Baryt, dampft ab usw.

Ist nur wenig Inosit vorhanden und tritt das Kristallisieren nicht ein, so muß man sich mit Nachweisung durch die mehr oder weniger modifizierte *Scheerer*sche Reaktion begnügen (siehe unten die Reaktionen des Inosit).

B. Di-Saccharide, $C_{12}H_{22}O_{11}$.

α) Rohrzucker, Saccharose, Sukrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Über die Darstellung des Zuckers im großen kann hier nur eine sehr kurze Andeutung gegeben werden. Das allgemeine Prinzip ist die Gewinnung von kristallisiertem Zucker aus den auf verschiedene Weise gewonnenen und gereinigten Säften der Zuckerrübe und des Zuckerrohres.

Die Saftgewinnung geschieht durch Auspressen oder durch systematisches Ausziehen des in kleine Stückchen (Schnitzel) zerteilten Materiales mit Wasser (Diffusion), und die letztere Methode wird jetzt in allen rationell eingerichteten Rübenzuckerfabriken ausgeführt, indem die in Schnitzel zerteilten Rüben mit mehr oder weniger heißem Wasser extrahiert werden, wobei vorzugsweise der Zucker (nebst Salzen) aus dem Innern der Zellen in das Wasser diffundiert. Der Saft des Zuckerrohres wird auch jetzt noch meistens durch Pressen gewonnen.

Die rohe Zuckerlösung (oder der Saft) wird zur Reinigung von Nichtzuckerstoffen mit Kalk aufgekocht (beim Zuckerrohrsaft darf nur wenig Kalk genommen werden) und zugleich wird Kohlensäure eingeleitet: hierbei werden Eiweißstoffe, Säuren usw. gefällt und in besonderen Filtrierapparaten (Filterpressen) entfernt. Einleiten von gasförmiger schwefliger Säure befördert die Reinigung.

Der klar filtrierte „Dünnsaft“ wird in großen, luftleer gemachten Apparaten (Vakuumsaftkörper) eingedampft und der „Dicksaft“ nach eventueller nochmaliger Reinigung in besonderen Vakuumapparaten soweit eingedunstet, daß sich Zuckerkristalle bilden.

[1]) *W. Marmé*, Ein Beitrag zum Vorkommen des Inosits. Annal. Chem. Pharm. Bd. **129**. S. 222 (1864).

[2]) *Kobert* und *Fick*, Untersuchungen über die Darstellung und Eigenschaften des Inosits sowie dessen Verbreitung im Pflanzenreiche. Chemiker-Zeitung. Jg. **1887**. S. 676.

[3]) *Franz Rosenberger*, Ein Verfahren zum Nachweis von Inosit in tierischen Geweben und Flüssigkeiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **56**. S. 373 (1908).

Der so erhaltene sehr konzentrierte, viel Kristalle enthaltende Sirup (die Füllmasse) kristallisiert beim Erkalten noch weiter, und dies besonders, wenn er währenddessen in besonderen Apparaten (Rührmaischen) in Bewegung gehalten wird: die mit unreinem Sirup vermischten Kristalle werden von dem Sirup in großen, sich schnell drehenden Trommeln (Zentrifugen) getrennt. Der so erhaltene Zucker wird, falls er rein genug ist, als „Kristallzucker" dem Konsum übergeben, oder aber der Rohrzucker wird in den Zuckerraffinerien mit Knochenkohle umkristallisiert.

Wenn aus den vom Rohrzucker abgeschleuderten Sirupen durch neues Eindampfen usw. kein kristallisierter Zucker mehr zu gewinnen ist, nennt man sie „Melasse".

Näheres möge man in den Büchern von *Stammer, Rümpler, Possanner, Claassen, Bartz, Krüger* usw. nachlesen.

Darstellung aus Vegetabilien im kleinen.

Zuerst versucht man, ob ein alkoholischer Auszug der Vegetabilien vor oder nach dem Verdunsten Kristalle liefert, ob der betreffende Sirup mit absolutem Alkohol Kristalle absetzt, ob Digestion des Auszuges mit Blutkohle zur Reinigung führt, so daß nachher Kristallisation eintritt, ob (wie im großen) Kochen der Pflanzensäfte mit Kalk, Saturieren mit Kohlensäure, Filtrieren, Verdunsten zum Ziele führt.

Ist der Rohrzucker nur in geringer Menge vorhanden, und geben die obigen Methoden kein Resultat, so wendet man die Methode von *E. Schulze* und *Seliwanoff*[1]) an, d. h. man fällt den Rohrzucker aus dem alkoholischen Auszuge der Substanz mit Strontiumhydroxyd, zersetzt den Niederschlag mit Kohlensäure usw. (siehe quantitative Bestimmung).

3) **Maltose,** $C_{12}H_{22}O_{11}$; Hydrat, $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$.

Maltose entsteht aus Stärke mit vielen Fermenten, so mit den Speichelfermenten und den im Organismus vorhandenen Fermenten, besonders aber mit den beim Keimen der Getreidesamen entstehenden Enzymen, welche als „Diastase" oder „diastatische Fermente", wohl auch „amylolytische Fermente" zusammengefaßt werden.

Aus der Stärke entstehen hierbei stets zugleich mit Maltose große Mengen von amorphen „Dextrinen", welche sich von der Maltose durch geringere Löslichkeit in Alkohol unterscheiden und wahrscheinlich, ebenso wie die Maltose, durch Spaltung aus dem sehr großen Molekül der Stärke hervorgehen.

Die Temperatur von 60 bis 65° C ist der schnelleren Umwandlung der Stärke am günstigsten, und je länger sie anhält, desto mehr Maltose bildet sich. Nach *Effront*[2]) wirken niedrigere Temperaturen günstiger für die

[1]) *E. Schulze* und *Seliwanoff*, Über den Nachweis von Rohrzucker in vegetabilischen Substanzen. Landwirtschaftl. Vers. Stat. Bd. 34. S. 408 (1887).

[2]) *J. Effront*, Action de l'acide fluorhydrique sur la diastase. Bull. Soc. Chim. (3). T. 4. p. 627 (1890).

Stärkeumwandlung, dies ist aber nur dann zu benutzen, wenn man Fluorwasserstoff oder Fluorammonium zusetzt, welche die Tätigkeit von Milchsäure- oder Buttersäurefermenten hemmen, denn diese Fermente oder Bazillen äußern ohne solchen Zusatz neben der Diastase ihre schädliche Zersetzungswirkung und bewirken Verluste an Zucker sowie durch die entstehenden Nebenprodukte erschwertes Kristallisieren der Maltose.

Nach *Fernbach* und *Wolff*[1]) erhält man eine fast totale Umwandlung von Stärke in Maltose, wenn man das Malz bei 50° C wirken läßt, und dies wird durch kleine Mengen Säure beschleunigt. (Siehe auch *Maquenne* und *Roux*.[2])

Soxhlet[3]), *Herzfeld*[4]) u. a. haben Vorschriften zur Maltosedarstellung gegeben.

Nach *Herzfeld* verarbeitet man 1 *kg* Stärke mit Wasser zu 10 *l* Kleister und digeriert diesen mit einem filtrierten Aufguß von 200 *g* Darrmalz in 1 *l* Wasser mindestens eine Stunde lang bei 57—60° C, kocht auf, filtriert, verdampft zum dünnen Sirup und erhält aus diesem durch systematisches Ausziehen mit Alkohol, welcher die Dextrine als Sirup ausfällt und die Maltose löst, Sirupe, welche allmählich kristallisieren. Man preßt die mit Methylalkohol angerührten kristallinischen Massen und reinigt die Maltose durch Umkristallisieren aus Äthyl- oder Methylalkohol.

γ) Trehalose, Mykose, $C_{12}H_{22}O_{11} + 2H_2O$.

Diese sich durch die Fähigkeit, schöne, harte Kristalle zu bilden, sehr von der Maltose unterscheidende Zuckerart hat die Formel der Maltose mit Zusatz von 1 Mol. H_2O, und sie liefert, wie jene, bei der Hydrolyse, 2 Mol. d-Glukose. Sie hat aber jedenfalls eine andere innere Konstitution, weil sie nicht reduziert, und weil die Hydrolyse nur langsam und mit starker Säure auszuführen ist.

Sie ist zuerst von *Wiggers*[5]) und *Mitscherlich*[6]) aus dem Mutterkorn gewonnen und von *Berthelot*[7]) in beträchtlicher Menge in der Trehala-Manna, den Cocons eines in Persien vorkommenden Rüsselkäfers

[1]) *A. Fernbach* und *J. Wolff*, Sur la transformation presque intégrale en maltose des dextrines provenants de la saccharification de l'amidon. Compt. rend. T. **142**. p. 1216 (1906).

[2]) *L. Maquenne* und *Eug. Roux*, Sur la constitution, la saccharification et la retrogradation des empois de fécule. Bull. Soc. Chim. (3). T. 33. p. 723 (1905); Compt. rend. T. **142**. p. 124 (1906).

[3]) *F. Soxhlet*, Das Verhalten der Zuckerarten zu alkalischen Kupfer- und Quecksilberlösungen. Journ. f. prakt. Chemie. (2.) Bd. **21**. S. 274 (1880).

[4]) *A. Herzfeld*, Über Maltose. Annal. Chem. Vol. **220**. p. 209.

[5]) *Wiggers*, Annal. Chem. Pharm. Bd. **1**. S. 173. Anm. (1832).

[6]) *Mitscherlich*, Über die Mykose, den Zucker des Mutterkorns. Journ. f. prakt. Chemie. (1.) Bd. **73**. S. 65 (1858).

[7]) *Berthelot*, Annal. chim. phys. (3). T. 55. p. 272 (1859).

aufgefunden: *Muntz*[1]), *Bourquelot*[2]). *Winterstein*[3]) fanden sie neuerdings in vielen Pilzen.

Die Darstellung ist sehr einfach. Man kocht die Pilze sowohl als auch die Trehala mit starkem Alkohol mehrfach aus und läßt die leicht kristallisierbare Trehalose sich aus den Filtraten abscheiden. Aus Trehala erhält man bis 20%, aus frischem Steinpilz (Boletus edulis) zirka 1%, aus getrockneten Pilzen weniger, indem in getrockneten Pilzen anstatt eines verschwundenen Anteiles der Trehalose sich Mannit finden kann. Übrigens erhielt *Muntz* aus trockenem Fliegenpilz gegen 10% Trehalose.

δ) Milchzucker, Laktose, $C_{12}H_{22}O_{12} + H_2O$.

Der Milchzucker wird im großen in Fabriken aus Molken, welche bei der Labkäserei abfallen, durch Aufkochen, Reinigen, Abdampfen im Vakuum, Kristallisieren dargestellt.

Zur Darstellung im kleinen kocht man die aus Magermilch durch Zusatz von Labpulver oder Labessenz erhaltenen, vom frischen Käse abgeseihten Molken auf, filtriert vom gefällten Albumin ab, setzt etwas Calciumkarbonat zu und dunstet auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup ein.

Der nach einiger Zeit auskristallisierte Milchzucker wird abgepreßt, in Wasser gelöst, die Lösung mit wenig Aluminiumsulfat und Calciumkarbonat, dann mit Blutkohle erwärmt, filtriert, verdunstet und kristallisiert. (Siehe *Eugling* und *Rüf*.[4])

C. Tri- und Polysaccharide.

α) Raffinose, Melitose, Melitriose, Gossypose, $C_{18}H_{32}O_{16} + 5H_2O$.

Diese im Baumwollsamen nach *Ritthausen*[5]) und *Böhm*[6]), in der Rübenmelasse nach *Loiseau*[7]), *Tollens*[8]) und *Rischbieth*, *Scheibler*,

---

[1]) *A. Muntz*, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **6.** S. 451 (1873).

[2]) *Em. Bourquelot* z. B. Sur le tréhalose des champignons à propos d'une note de *M. Winterstein*. Bull. Soc. chim. (3.) T. **11.** p. 353.

[3]) *E. Winterstein*, Zur Kenntnis der Trehalose. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **26.** S. 3094 (1893).

[4]) *W. Eugling* und *E. Rüf*, Über Gewinnung von rohem und raffiniertem Milchzucker. *Biedermanns* Zentralbl. f. Agrikulturchemie. Jg. **1882.** S. 346.

[5]) *H. Ritthausen*, Über Melitose aus Baumwollsamen. Journ. f. prakt. Chem. (2). Bd. **29.** S. 351 (1884).

[6]) *Böhm* s. bei *H. Ritthausen* und *Felix Weger*, Über Betain aus Preßrückständen der Baumwollsamen. Journ. f. prakt. Chem. (2). Bd. **30.** S. 37 (1884).

[7]) *D. Loiseau*, Sur une nouvelle substance organique cristallisée. Compt. rend. T. **82.** p. 1058 (1876); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **9.** S. 732 (1876).

[8]) *B. Tollens*, Über Raffinose (Melitose?), eine hochpolarisierende Zuckerart aus der Melasse. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18.** S. 26, 2611 (1885). — *P. Rischbieth* und *B. Tollens*, Versuche mit Melasse und Baumwoll-Raffinose. Ann. Chem. Vol. **232.** p. 173 (1885).

v. Lippmann[1], *Herzfeld* und Anderen, und in der Eucalyptus-Manna aus Tasmanien nach *Berthelot*[2] und nach *Tollens* und *Rischbieth* sowie *Scheibler* vorkommende Zuckerart läßt sich am leichtesten aus auskristallisierter sogenannter „Restmelasse“ der Strontium-Zuckerfabriken rein darstellen. Sie findet sich in sehr geringer Menge in den Zuckerrüben, und, wenn aus dem Rübensafte der Rohrzucker gewonnen wird, hält die Mutterlauge, d. h. die Melasse, mehr Raffinose als der ursprüngliche Rübensaft.

In einigen Zuckerraffinerien werden aus der Melasse Zucker und Raffinose mit Strontiumhydroxyd ausgefällt und abfiltriert. Wenn aus diesem in Wasser suspendierten und mit Kohlendioxyd zersetzten Saccharate durch Absaugen eine Zuckerlösung gewonnen und diese eingedampft wird, kristallisiert der Rohrzucker aus und der Muttersirup ist viel reicher an Raffinose als die ursprüngliche Melasse, und wenn diese Operation ein oder mehrmals wiederholt wird, resultiert schließlich die „Restmelasse“, welche 20% oder mehr Raffinose enthalten kann und im Laufe einiger Jahre sich mit Nadeln von Raffinose erfüllt (*Tollens* [siehe oben], *v. Lippmann*, *Herzfeld*). Man braucht, um die Raffinose zu gewinnen, nur die auskristallisierte Masse nach Zusatz von etwas Alkohol und Wasser durch Pressen vom Sirup zu befreien und den Preßrückstand aus verdünntem Alkohol mit Kohle mehrfach umzukristallisieren.

Auch die noch nicht auskristallisierte Strontian-Restmelasse ist nach verschiedenen Verfahren von *Scheibler*, *Gunning*, *Stone* u. a. zur Darstellung von Raffinose zu benutzen; es spielt hierbei der Umstand, daß Raffinose in wasserfreiem Methylalkohol viel löslicher ist als Rohrzucker, eine Rolle (siehe *v. Lippmann*, Zuckerarten, S. 1625).

Aus Baumwollsamen erhält man nach den oben Genannten sowie *Tollens* Raffinose durch Extraktion mit Alkohol. Man erhitzt Baumwollsamenmehl des Handels mit ungefähr 70%igem Alkohol im Wasserbade am Rückflußkühler; vom abgepreßten Auszug wird der Alkohol abdestilliert, der Rückstand wird von Harz und Fett mechanisch sowie durch Ausschütteln mit Äther befreit und liefert durch Verdunsten Raffinosekristalle, welche durch Umkristallisieren gereinigt werden.

Ähnlich, d. h. durch Extrahieren mit Alkohol usw., erhält man Raffinose (*Berthelots* Melitose) aus Eucalyptus-Manna.

β) **Stachyose**, $C_{24}H_{42}O_{21} + 4H_2O$.

Als Beispiel der Darstellung einer drei oder nach *Tanret* vier Gruppen von je 6 C enthaltenden Zuckerart möge diejenige der Stachyose genannt werden.

---

[1] *Edmund O. v. Lippmann*, Über den sogenannten „Pluszucker“ und über die Quelle der in den Produkten der Zuckerfabrikation enthaltenen Raffinose (Melitose). Zeitschr. d. Ver. d. d. Rübenzuckerindustrie. Jg. **1885**. S. 257; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 3087; Ref. S. 188 (1885).

[2] *Berthelot*, Ann. chim. phys. (3). T. **46**. p. 66 (1856).

Stachyose findet sich nach *E. Schulze*[1]) und *v. Planta* in den Knollen von Stachys tuberifera und nach *Tanret*[2]) in den Mutterlaugen der Mannitgewinnung aus Eschenmanna. *Tanret* nannte sein Produkt vor der Feststellung der Identität mit Stachyose „Manneotetrose“. Sie dreht stark rechts; (α) D des Hydrats = + 133.5°; sie liefert bei der Hydrolyse 2 Mol. Galaktose, 1 Mol. Glukose und 1 Mol. Fruktose (nach *E. Schulze* je 1 Mol. dieser Glykosen).

Nach *v. Planta* und *E. Schulze* reinigt man den Saft der Stachysknollen durch Fällung erst mit Bleiessig, dann mit Quecksilbernitrat und Filtration, entfernt Blei und Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, neutralisiert mit Ammoniak, engt ein, fällt mit Alkohol unreine Stachyose als Sirup, löst diesen in Wasser und reinigt diese Lösung durch Fällung mit Phosphorwolframsäure. Nach Entfernung des Niederschlages wird die Flüssigkeit mit Barytwasser und Kohlensäure von Phosphorwolframsäure befreit, und das Filtrat liefert nach dem Eindunsten und dem Behandeln mit Alkohol nach einiger Zeit kristallisierte Stachyose. *Tanret* hat zur Darstellung der Stachyose die Eigenschaft vieler Kohlenhydrate, durch alkalische Basen mit Alkohol gefällt zu werden, benutzt. Er versetzte den mit $^1/_{10}$ Volum Bleiessig heiß gefällten, vom Niederschlage abfiltrierten und mit verdünnter Schwefelsäure von Blei befreiten Stachyssaft (sowie auch die Mannitmutterlaugen) mit Barytkristallen und Alkohol. Der Niederschlag wird in Wasser aufgeschwemmt und mit Kohlensäure behandelt, worauf das eingedunstete Filtrat durch Behandeln mit Alkohol kristallisierte Stachyose liefert.

[1]) *A. v. Planta* und *E. Schulze*, Über ein neues kristallisierbares Kohlenhydrat; zur Kenntnis der Stachyose und über einige Bestandteile der Wurzelknollen von Stachys tubifera. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. S. 1692 (1890); Jg. **24**. S. 2705 (1891); Landw. Vers.-Stat. Bd. **40**. S. 277 (1892); Bd. **41**. S. 123 (1893).

[2]) *C. Tanret*, Sur deux sucres nouveaux retirés de la manne, le mannéotétrose et le manninotriose. Composition de la manne. Sur le Stachyose. Bull. Soc. chim. (3). T. **27**. p. 948 (1902); Bd. **29**. p. 888 (1903).

B. Die wichtigsten Methoden zum qualitativen Nachweise der Zuckerarten.

Von **B. Tollens,** Göttingen.

a) Allgemeine Reaktionen.

Zur Beantwortung der Frage, ob eine aus pflanzlichen oder tierischen Substanzen abgeschiedene Substanz ein Zucker oder ein Kohlehydrat ist oder diese enthält, prüft man wohl zuerst das Verhalten beim Erhitzen im Reagenzrohr. Es kann ein Kohlenhydrat vorhanden sein, wenn Schwärzung und Verkohlung und ferner ein eigentümlich an verkohlende Weinsäure erinnernder süßlicher Geruch auftreten, welchen *H. Schiff* einmal als „Karamellengeruch“ bezeichnet hat.

Die Zuckerarten zersetzen sich nämlich beim Erhitzen unter Entwicklung mannigfacher Stoffe, wie Kohlenoxyd, Kohlendioxyd, Ameisensäure, Essigsäure, Aceton, Kondensationsprodukten des letzteren, Furfurol, Aldehyd usw., und diese besitzen zum Teil einen besonderen Geruch. Unter diesen Stoffen ist besonders das Furfurol, $C_5H_4O_2$, hervorzuheben, welches einen angenehmen, an Bittermandelöl erinnernden Geruch besitzt. Es ist in der kleinsten Menge leicht durch die schöne rote, von *Schiff*[1]) entdeckte Reaktion mit Anilin- oder Xylidinacetat nachzuweisen, indem man ein Streifchen Filtrierpapier, auf welches ein Tropfen einer Lösung von Anilinacetat gebracht wurde, in die Mündung des Probierglases hält.

Die Lösung von Anilinacetat stellt man am besten her, indem man gleiche Volume Anilin und Wasser in ein Probierrohr gibt und unter starkem Schütteln so lange tropfenweise Eisessig hinzufügt, bis die vorher milchige Flüssigkeit plötzlich klar wird *(Tollens).*

Wenn die Zuckerarten rein vorliegen, und auch, wenn sie in pflanzlichen oder tierischen Stoffen, mit vielen anderen Substanzen zugleich, vorkommen, benutzt man zu ihrer Nachweisung verschiedene zum Teil recht empfindliche und charakteristische Reaktionen.

b) Reduktionsreaktionen.

Zuerst versucht man meistens, ob die den Glykosen innewohnende Reduktionskraft gegenüber den alkalischen Metalllösungen oder auch

[1]) *Hugo Schiff,* Über Farbstoffbasen aus Furfurol. Zweite Abhandlung. Ann. Chem. Vol. **239**. p. 380 (1887).

gegenüber sonstigen Substanzen, welche, indem sie von den Zuckerarten reduziert werden, Farbenerscheinungen zeigen, vorhanden ist.

Diese Reduktionswirkungen zeigen die Mono-Saccharide, d. h. die Glykosen, seien es Pentosen, Hexosen usw., direkt. Die Di-, Tri- und Polysaccharide äußern sie teilweise, wie Milchzucker und Maltose, direkt, meistens jedoch erst nach der durch Erhitzen mit Säuren oder durch Enzyme bewirkten Hydrolyse: man erhitzt zu diesem Zwecke die betreffende Flüssigkeit mit ca. $^1/_{20}$ ihres Volums an konzentrierter Salzsäure 5 Minuten oder auch länger im kochenden Wasserbade, neutralisiert die abgekühlte Flüssigkeit mit Sodalösung und prüft mit *Fehling*scher Lösung.

Gut ist es, beim Prüfen von Flüssigkeiten, welche neben Zucker viele andere Stoffe enthalten, vor der eigentlichen Reaktion eine Reinigung stattfinden zu lassen oder aber den Zucker möglichst vorher in einem kleinen Quantum Substanz zu konzentrieren (siehe z. B. Glukose im Harn).

Außer den alkalischen Kupferlösungen (*Fehling*sche Lösung, *Trommer*sche Probe etc.) und den schwach säuerlichen Kupferlösungen, welche zum Teil als *Barfoed*sche oder *Soldaini*sche Lösungen bekannt sind, und welche in einem anderen Teile dieses Handbuches beschrieben werden, ist zuerst die alkalische Quecksilberlösung, welche von *Knapp*[1]) und von *R. Sachsse*[2]) empfohlen wird, zu erwähnen.

Sachsse löst in einer wässerigen Lösung von 25 *g* Jodkalium, 18 *g* Quecksilberjodid auf; setzt 50 *g* Kaliumhydroxyd zu und füllt zu 1 *l* auf. Die klare Lösung gibt mit der Zuckerlösung beim Erwärmen eine graue Trübung von Quecksilber.

Alkalische Wismutlösungen geben einen schwarzen Niederschlag; man setzt entweder der zu prüfenden Flüssigkeit, z. B. Harn, etwas Natronlauge und sehr wenig weißes basisches Wismutnitrat zu und erwärmt zum Kochen, worauf Schwarzfärbung des Absatzes die Gegenwart selbst von Spuren Zucker anzeigt, oder man wendet vorher bereitete alkalische Wismutlösungen an.

So stellt *Nylander*[3]) sein längere Zeit haltbares Wismutreagenz aus 2 *g* basischem Wismutnitrat, 4 *g* Seignettesalz und 100 *g* 8%iger Natronlauge her.

Über die Verwendung der *Nylander*schen (nach *Hammarsten* besser *Almén*sche genannten) Lösung berichtet *Hammarsten*.[4])

Man soll 1 *cm*³ Reagenzlösung und 10 *cm*³ Harn 2 bis 5 Minuten lang im Reagenzglase über einer Flamme kochen, dann 5 Minuten stehen lassen und beobachten, ob ein schwarzes Sediment sich gebildet hat.

[1]) *Carl Knapp*, Über eine neue Methode zur Bestimmung des Traubenzuckers. Ann. Chem. Vol. **154**. p. 252 (1870).

[2]) *R. Sachsse*, Die Farbstoffe und Kohlenhydrate. Leipzig, Voss. S. 213 (1877).

[3]) *Emil Nylander*, Über alkalische Wismutlösung als Reagens auf Traubenzucker im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 8. S. 175 (1884).

[4]) *Olof Hammarsten*, Vergleichende Untersuchungen über den Wert der *Almén*schen Wismutprobe und der *Worm-Müller*schen Kupferprobe bei der Untersuchung des Harnes auf Zucker. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **50**. S. 45, 64 (1906/1907).

Das Eintreten der Reaktion im Harn soll nach *Bechhold*[1]) durch sehr geringe Mengen Quecksilber (so nach häufigem Berühren der Hände mit Sublimatlösung) verhindert werden; dies ist nach *Hammarsten*[2]) nicht der Fall.

Brücke[3]) wendet eine Lösung von Wismutnitrat und Jodkalium in Salzsäure an, mit welcher aus dem Harn erst Eiweiß etc. ausfällt. Dem Filtrat von diesem Niederschlag setzt er Natronlauge zu und kocht. Bei Gegenwart von Glukose färbt sich der bei Zusatz von Natron entstandene weiße Niederschlag grau bis schwärzlich.

Sehr leicht werden ammon-alkalische Silberlösungen (siehe *Tollens*[4]) von reduzierenden Zuckerarten schon in der Kälte grau oder schwarz gefärbt, und zuweilen setzt sich das Silber als Spiegel an das Glas.

Da ammon-alkalische Silberlösungen jedoch ebenfalls von Aldehyden und vielen anderen Stoffen leicht reduziert werden, darf man nicht eher auf die Gegenwart von Zucker schließen, als bis man sich von der Abwesenheit dieser anderen Stoffe überzeugt hat.

Bei Gegenwart von Alkali werden auch Gold- und Platinlösungen durch Glykosen reduziert, ebenfalls Eisenchlorid (zu Ferrosalz) und Nickel- und Kobaltsalz, ferner wird durch Glykose molybdänsaures Ammonium mit blauer Farbe reduziert, ebenfalls Methylenblau. Man sehe über diese und andere hierher gehörende Reaktionen die Bücher von *v. Lippmann* und *Tollens* nach.

c) Phenylhydrazinreaktionen.

Sehr wichtig sind zur Auffindung und Unterscheidung der Zuckerarten die von *E. Fischer* in die Wissenschaft eingeführten Phenylhydrazine, und zwar sowohl das Phenylhydrazin, $C_6H_5NH.NH$ selbst als auch die asymmetrisch substituierten Phenylhydrazine,

wie Methyl-Phenylhydrazin, $\begin{matrix}C_6H_5\\CH_3\end{matrix}>N.NH_2$,

Benzyl-Phenylhydrazin, $\begin{matrix}C_6H_5\\C_7H_7\end{matrix}>N.NH_2$,

Diphenylhydrazin, $\begin{matrix}C_6H_5\\C_6H_5\end{matrix}>N.NH_2$,

Para-Brom-Phenylhydrazin, $\begin{matrix}C_6H_5\\C_6H_4Br\end{matrix}>N.NH_2$,

ferner Naphtyl-Phenylhydrazin, $\begin{matrix}C_6H_5\\C_8H_7\end{matrix}>N.NH_2$ usw.

---

[1]) *H. Bechhold*, Die Hemmung der *Nylander*schen Zuckerreaktion bei Quecksilber- und Chloroformharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 371 (1905).

[2]) *Olof Hammarsten*, Vergleichende Untersuchungen über den Wert der *Almén*schen Wismutprobe und der *Worm-Müller*schen Kupferprobe bei der Untersuchung des Harnes auf Zucker. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **50**. S. 72 (1906/1907).

[3]) *Ernst Brücke*, Über eine neue Art, die *Böttger*sche Zuckerprobe anzustellen. Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. **15**. S. 100 (1876); Wien. Akad. Ber. Bd. **72**. [3.] S. 20.

[4]) *B. Tollens*, Über ammoniakalische Silberlösung als Reagens auf Aldehyd und über das Verhalten der Dextrose zur ammoniakalischen Silberlösung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **15**. S. 1635 (1882); ebenda Jg. **16**. S. 921 (1883).

Wie S. 57 schon angeführt wurde, tritt beim Zusammenbringen von Glykosen mit Phenylhydrazin zuerst die Bildung von Phenylhydrazonen ein, indem O des Zuckers sich mit H_2 des Phenylhydrazinstickstoffs zu H_2O verbindet.

So gibt Mannose nach

$$\underset{\text{Mannose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Phenylhydrazin}}{NH_2.NH.C_6H_5} = \underset{\text{Mannose-Phenylhydrazin}}{C_6H_{12}O_5:N.NH.C_6H_5}$$

das sehr schwer lösliche Phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}N_2O_5$.

Glukose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose geben zwar analoge Hydrazone, diese sind aber fast sämtlich leichter löslich; übrigens eignen sie sich zuweilen zur Auffindung der betreffenden Zuckerarten (siehe diese).

Die substituierten Phenylhydrazine bilden Hydrazone, welche meistens schwerer löslich sind als die Hydrazone des einfachen Phenylhydrazins, und welche zuweilen zur Auffindung von Zuckerarten brauchbar sind.

So bildet nach *Neuberg* [1]), *Müther* [2]), *Maurenbrecher* und *Tollens* [3]), *Votoček* [4]) u. a. die Abscheidung der Arabinose als Di-Phenyl-Hydrazon das beste Mittel zur Gewinnung und sicheren Nachweisung der verschiedenen Modifikationen dieser Glykose.

Zur qualitativen Auffindung der Zuckerarten ist jedoch besonders die meistens in der Wärme eintretende „Osazonbildung" brauchbar. Zu 1 Mol. der Zucker treten 2 Mol. der Phenylhydrazine, indem 2 Mol. H_2O und weiter 2 Atome Wasserstoff (welcher anderweitig verwertet wird) austreten. So entstehen z. B.

$$C_6H_{10}O_4(N.NH.C_6H_5)_2 \text{ oder } C_{18}H_{22}N_4O_4$$
Glukose-Phenylosazon oder Glukosazon

$$C_5H_8O_3(N.NH.C_6H_5)_2 \text{ oder } C_{17}H_{20}N_4O_3$$
Arabinose-Phenylhydrazon oder Arabinosazon.

Diese Osazone sind meistens in kaltem oder auch heißem Wasser recht schwer löslich, sie lassen sich durch Umkristallisieren reinigen, und sie sind durch ganz bestimmte Schmelzpunkte (richtiger wohl Zersetzungspunkte) charakterisiert.

Sie zeigen teilweise auch bestimmte Kristallformen und ebenfalls verschiedenes Verhalten gegen das polarisierte Licht.

[1]) *C. Neuberg* und *J. Wohlgemuth*, Über das Verhalten stereoisomerer Substanzen im Tierkörper. I. Mitteilung. Über das Schicksal der 3 Arabinosen im Kaninchenharn; *Carl Neuberg*, Über die Isolierung der Ketosen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **35**. S. 31 (1902); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 959 (1902).

[2]) *A. Müther* und *B. Tollens*, Über einige Hydrazone und ihre Schmelzpunkte. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **37**. S. 312 (1904).

[3]) *B. Tollens* und *A. D. Maurenbrecher*, Über die Diphenylhydrazone der l-Arabinose und der Xylose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **38**. S. 500.

[4]) *E. Votoček*, Beiträge zur Unterscheidung von Zuckerarten. Chemiker-Ztg. Bd. **26**. Ref. S. 141 (1902); das. nach Chem. Listy. Vol. **26**. p. 122 (1902).

Sie sind nach *Neuberg*[1]) zum großen Teile optisch aktiv, und dies ist zur Identifizierung der betreffenden Zuckerarten zu gebrauchen.

Wenn man nach *Neuberg* 0·2 *g* der Osazone kalt in einem Gemenge von 4 *g* Pyridin und 6 *g* absolutem Alkohol löst und die Flüssigkeit dann im 100 *mm*-Rohr im Kreisgradapparat beobachtet, findet man folgende Winkeldrehungen:

l-Arabinosephenylosazon	+ 1° 10′
l-Arabinose-p-bromphenylosazon . .	+ 0° 28′
Xylosephenylosazon	— 0° 15′
Xylose-p-bromphenylosazon	± 0°
Rhamnosephenylosazon	+ 1° 24′
d-Glukosephenylosazon	— 1° 30′
d-Glukose-p-bromphenylosazon . . .	— 0° 31′
d-Galaktosephenylosazon	+ 0° 48′
Sorbinosephenylosazon	— 0° 15′
Maltosephenylosazon	+ 1° 30′
Laktobiosephenylosazon	± 0°
Glukuronsaures p-bromphenylhydrazin	— 7° 25°

(Über Polarisation im allgemeinen siehe später.)

Wenn es sich darum handelt, die Osazone mittelst der reinen Zuckerarten darzustellen, benutzt man meistens die Originalvorschrift von *E. Fischer*[2]), indem man 1 *g* Zucker, 2 *g* salzsaures Phenylhydrazin, 3 *g* kristallisiertes Natriumacetat ($C_2H_3O_2 . Na + 3 H_2O$) und 20 *g* Wasser $^3/_4$ bis $1^1/_2$ Stunden unter gelegentlichem Umrühren im kochenden Wasserbade erhitzt.

Am besten geschieht dies in großen, zirka 50 *cm*³ fassenden Probierröhren, welche man in durch eine Flamme erhitzten, Wasser enthaltenden Bechergläsern als Wasserbädern erhitzt.

Statt der obigen Mischung kann man auch direkt essigsaures Phenylhydrazin anwenden, indem man Phenylhydrazin und Essigsäure (zirka 5 Tropfen Phenylhydrazin und 3 Tropfen Essigsäure) mischt. Bei der Anwendung von substituierten Phenylhydrazinen verfährt man ähnlich.

Entsteht schon nach $^1/_2$ bis 1 Stunde Stehens oder nach kurzem gelinden Erwärmen ein heller, meistens gelber Niederschlag, so kann man die Gegenwart von Mannose vermuten.

Die klare oder vom ausgeschiedenen Mannosephenylhydrazon abfiltrierte Lösung wird nun im Wasserbade erhitzt, und sie scheidet, bei Gegenwart von Fruktose, sehr bald, langsamer mit den anderen Glykosen kristallinische stark gelbe Flocken ab. Mit Glukose und Fruktose ent-

[1]) *Carl Neuberg*, Über die Reinigung der Osazone und zur Bestimmung ihrer optischen Drehungsrichtung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 3384 (1899).

[2]) *Emil Fischer*, Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **17**. S. 579 (1884).

steht dasselbe Osazon (welches folglich am besten nicht Glukosazon, sondern Glykosazon genannt wird), mit anderen Glykosen entstehen ähnlich aussehende Flocken.

Bei einigen Glykosen, so bei der Galaktose, vermehrt sich die Osazonausscheidung noch beim Erkalten, und beim Milchzucker scheidet sich das Osazon erst beim Erkalten ab.

Die Zeit der Abscheidung wird nach *Sherman* und *Williams*[1]) durch die Gegenwart anderer Zuckerarten erheblich modifiziert.

Die abfiltrierten, gut ausgewaschenen, dann zwischen Papier gepreßten oder auf Ton abgesogenen Osazone kristallisiert man aus ca. 50%igem Alkohol um und setzt, da sie meistens sich selbst beim Kochen der Flüssigkeit schwer lösen, nach *Neuberg* tropfenweise Pyridin zu, bis Lösung eintritt.

Aus der, wenn erforderlich, filtrierten dunklen Lösung kristallisiert das reine Osazon, welches über Schwefelsäure oder an der Luft in gelinder Wärme getrocknet wird.

Der Schmelzpunkt wird dann bestimmt, und hierbei ist als Regel zu beachten, daß die Erhitzung schnell[2]) geschehen muß, da die Osazone meistens keine eigentlichen Schmelzpunkte, sondern vielmehr Zersetzungspunkte besitzen, und diese Zersetzung bei langsamem Erhitzen früher eintritt als bei schnellem Erhitzen und, sobald ein Partikelchen sich unter Schmelzung zersetzt hat, die ganze Masse schmilzt und sich unter Gasentwicklung zersetzt.

Am besten geschieht die Schmelzpunktsbestimmung auf die von *Müther* und *Tollens*[3]) beschriebene Weise.

In ein sehr kleines, nur 3 cm^3 fassendes Kölbchen mit konzentrierter Schwefelsäure, in welche man, um sie weiß zu halten, ein Körnchen Salpeter gebracht hat, stellt man neben die etwas vom Boden des Kölbchens entfernte Thermometerkugel das sehr dünnwandige (s. u.) Röhrchen mit der Substanz und erhitzt auf einem Drahtnetz mit mäßig kleiner Flamme, so daß das Quecksilber des Thermometers schnell steigt. Von Zeit zu Zeit mäßigt oder entfernt man die Flamme (oder man dreht an einem Brenner mit Zündflämmchen die Hauptflamme aus, so daß nur das Zündflämmchen bleibt), um Temperaturausgleich zu erhalten. Sobald man sich dem vermuteten Schmelzpunkte auf ca. 5—7° genähert hat, hält man mit dem Erhitzen so häufig an, daß das Quecksilber nur langsam steigt,

[1]) *H. C. Sherman* und *R. H. Williams*, Einfluß der Verdünnung und der Gegenwart anderer Zucker auf die Osazonprobe für Glukose und Lävulose. Chem. Zentralbl. Jg. **1906**. II. S. 229; daselbst nach Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. **28**. p. 629 (1906).

[2]) *Emil Fischer*, Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten II und über die Hydrazone. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **20**. S. 826 (1887); Jg. **21**. S. 987 (1888). — *K. Beythien* und *B. Tollens*, Beobachtungen über die Schmelzpunkte der Osazone und über Phenylhydrazinarbeiten. Annal. Chem. Vol. **255**. p. 217. — *Maquenne*, s. *Tollens*, Handb. d. Kohlenhydrate. II. S. 34.

[3]) *A. Müther* und *B. Tollens*, Über einige Hydrazone und ihre Schmelzpunkte. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **37**. S. 314 (1904).

und operiert so, daß es in dem Momente des Schmelzens der Substanz zur Ruhe kommt.

Das Erhitzen von der Zimmertemperatur bis 204° dauert auf diese Weise höchstens 3—4 Minuten.

Die Schmelzröhrchen stellt man sich nach *Bunsens*[1]) Methode aus einem neuen und noch nicht zu sonstigen Zwecken gebrauchten Probierrohr durch Erweichen in der Gebläseflamme und schnelles Ausziehen in der Weite von 1—1·5 *mm* her. Die mit dem Schreibdiamanten geritzten und dann abgebrochenen, ca. 8 *cm* langen Röhrchen werden an einem Ende zugeschmolzen und man läßt unterhalb des Raumes für die Substanz ein 4 *mm* langes massives Stielchen, welches die Substanz vom Boden ab und neben die Thermometerkugel bringt.

Sobald die Schmelztemperatur erreicht ist, findet Aufschäumen statt, indem die flüssig gewordene Masse von dem entwickelten Gase lebhaft in die Höhe getrieben wird.

Die Schmelzpunkte liegen zum Teil recht hoch, so schmilzt das Glykosazon (aus Glukose, Fruktose und Mannose) bei 204—205°, das Galaktosazon bei 195°, das Arabinosazon dagegen schon bei 160°.[2])

So einfach wie mit den reinen Zuckern verlaufen die Phenylhydrazinreaktionen häufig nicht mit den Naturprodukten, welche zuweilen mehrere Zucker und meist mancherlei andere Substanzen enthalten. Zuweilen scheidet sich mit der Phenylhydrazin-Acetatmischung in der Kälte oder in gelinder Wärme eine öl- oder pechartige Masse ab, von welcher man am besten die Flüssigkeit durch Abgießen befreit.

Dann ist zuweilen das Osazon auch von brauner Farbe und mehr oder weniger weich, es läßt sich jedoch häufig nach dem Abfiltrieren und Auswaschen durch Umkristallisieren aus Wasser, Alkohol und wenig Pyridin in reinerer Form und zuletzt in gelben Nädelchen gewinnen.

Über solche Osazonoperationen mit gleichzeitig vorhandenen verschiedenen Zuckerarten findet man näheres z. B. in den Abhandlungen von *Neuberg*[3]) und von *Votoček* und *Vondraček*.[4])

d) Farbenreaktionen.

Zuerst möge angegeben werden, daß sämtliche Zuckerarten, welche alkalische Kupferlösungen reduzieren — seien es Monosaccharide oder Glykosen, seien es Disaccharide (z. B. Maltose und Milchzucker) —, sich

---

[1]) *R. Bunsen*, Flammenreaktionen. Ann. Chem. Vol. 138. p. 266 (1866).

[2]) Eine recht vollständige Zusammenstellung der Schmelzpunkte der bis 1903 dargestellten Osazone und Hydrazone findet sich in der Dissertation von Dr. *A. Müther*, Göttingen 1903, und ist auch im Buchhandel (Göttingen, Huth) zu haben.

[3]) *Carl Neuberg*, Über die Reinigung der Osazone und zur Bestimmung ihrer optischen Drehungsrichtung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 32. S. 3384 (1899).

[4]) *Emil Votoček* und *R. Vondraček*, Über die Trennung bezw. Isolierung reduzierender Zuckerarten mittelst aromatischer Hydrazine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 37. S. 3854 (1904).

in Lösung mit stark alkalischen Substanzen, wie Kaliumhydroxyd, Natriumhydroxyd, Kalk, Baryt, besonders beim Erwärmen, stark gelb bis braun färben, indem mancherlei gefärbte und nicht gefärbte Stoffe und daneben meistens Milchsäure entstehen.

Es kann dies Verhalten zur Unterscheidung von Glukose, welche sich mit Natronlauge gelb färbt, und Rohrzucker, welcher hierbei ungefärbt bleibt, dienen.

Besonders aber versteht man unter dem Namen „Farbenreaktionen" das Verhalten der Zuckerarten zu Stoffen der Benzol- und Naphtalinreihe bei Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure oder Salzsäure.

Wie u. a. durch die Untersuchungen von *Tollens* und *v. Grote*[1]), *Kehrer*[2]) und *Wehmer*[3]) sowie von *Conrad* und *Gutzeit*[4]) erwiesen ist, werden die Kohlenhydrate durch die Wirkung starker Säuren unter Bildung von (neben Lävulinsäure, Ameisensäure, etwas Furfurol usw.) Huminstoffen zersetzt. Diese Zersetzung tritt bei verschiedenen Zuckern mit verschiedener Leichtigkeit auf, und zwar am leichtesten, wie es scheint, bei Fruktose und bei den, wie z. B. Rohrzucker, Fruktose enthaltenden Zuckerarten, während sie bei Glukose und Galaktose und den diese enthaltenden Disacchariden, wie z. B. Milchzucker, erst bei stärkerem Erwärmen eintritt.

So kann man Rohrzucker und Fruktose von Milchzucker und Glukose schnell unterscheiden, indem man in die kalten Lösungen dieser Zucker im Reagenzglase einige Kubikzentimeter Schwefelsäure so langsam am Rande einfließen läßt, daß sich die Flüssigkeiten nicht mischen. Bei Gegenwart von Fruktose und Rohrzucker färbt sich die Berührungszone braun, bei Glukose, Milchzucker usw. dagegen nicht.

Sind beim Zusammenbringen von Zuckerlösungen mit konzentrierten Säuren aromatische Stoffe und besonders Phenole gegenwärtig, so verbinden sie sich mit den Huminstoffen oder sonstigen Zwischenstoffen, z. B. Oxymethylfurfurol[5]), zu dunkel gefärbten amorphen Substanzen.[6])

[1]) *A. Freih. v. Grote* und *B. Tollens*, Untersuchungen über Kohlehydrate. I. Über die bei Einwirkung von Schwefelsäure auf Zucker entstehende Säure (Lävulinsäure). Ann. Chem. Vol. **175**. p. 181 (1875).

[2]) *A. Freih. v. Grote* und *B. Tollens*, Untersuchungen über die Lävulinsäure oder β-Acetopropionsäure. I. Über Darstellung und Eigenschaften der Lävulinsäure. II. Über die Bildung von Lävulinsäure aus verschiedenen Kohlehydraten. Ann. Chem. Vol. **206**. p. 207, 226 (1881).

[3]) *C. Wehmer* und *B. Tollens*, Über die Bildung von Lävulinsäure, eine Reaktion aller wahren Kohlehydrate. Ann. Chem. Vol. **243**. p. 314 (1888).

[4]) *M. Conrad* und *M. Gutzeit*, Untersuchungen über die Einwirkung verdünnter Säuren auf Traubenzucker und Fruchtzucker. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **19**. S. 2569 (1886).

[5]) Siehe z. B. *A. Müther* und *B. Tollens*, Über die Produkte der Hydrolyse von Seetang (Fucus), Laminaria und Carragheenmoos. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **37**. S. 303 (1904).

[6]) *B. Tollens*, Über das Verhalten des Zuckers zu Säuren und Phenol. Chemiker-Zeitung. Jg. **1887**. S. 77.

Diese bei den obigen Reaktionen auftretenden Stoffe färben entweder die ganze Flüssigkeit oder die Berührungszone zwischen der konzentrierten Säure und der übrigen Flüssigkeit, während bei Abwesenheit von Kohlenhydrat keine Färbung auftritt.

Von diesen allgemeinen Reaktionen ist besonders die nach *Molisch*[1]) benannte α-Naphtolreaktion in Gebrauch, welche zuerst von *Reichl*[2]), dann von *Ihl*[3]) und von *Molisch, v. Udranski*[4]) und vielen anderen studiert worden ist.

Man bringt hierzu 1—2 cm^3 der auf Zucker zu prüfenden Lösung und 1—2 Tropfen einer 10—20%igen alkoholischen Lösung von α-Naphtol in ein Probierglas und läßt vorsichtig einige Kubikzentimeter konzentrierter reiner, von Salpetersäure ganz freier, Schwefelsäure so einlaufen, daß sie sich am Boden des Rohres ansammelt. Bei Gegenwart von Fruktose, Rohrzucker etc. bildet sich sogleich eine violette Zone, und bei Gegenwart von anderen Zuckern tritt beim vorsichtigen Mischen oder Erwärmen diese Färbung, sei es an der Berührungsfläche, sei es in der ganzen gemischten Flüssigkeit, auf. Die Reaktion ist recht empfindlich.

Wendet man statt α-Naphtol Thymol an, so ist die auftretende Färbung rot (nach *Molisch* zinnoberrot) und mit Menthol, Kampfer, Resorzin, Diphenylamin etc. treten ähnliche Färbungen auf, welche von *v. Udranski* „Furfurolreaktionen" genannt wurden.

Besonders wichtig zur Untersuchung einiger Zuckerarten sind die bei Gegenwart von Phenolen beim Erwärmen mit starker Salzsäure eintretenden Färbungen; abgesehen von den mit Thymol etc. auftretenden Kohlenhydratreaktionen sind hier die mit Resorzin, Orzin und Naphtoresorzin erscheinenden zur Auffindung von Fruktose und anderen Ketosen[5]) einerseits und von Pentosen andrerseits in Benutzung gekommenen Spezialreaktionen von Wichtigkeit.

Die Aldosen, Glukose, Mannose, Galaktose geben nach *Rorive* und *Tollens*[6]) beim Kochen mit Naphtoresorzin, Salzsäure und Wasser dunkle Absätze, welche nach dem Abfiltrieren und dem Auswaschen mit Wasser sich in Alkohol zu mißfarbenen, bei Galaktose mehr lilafarbenen Flüssigkeiten lösen, welche eine bemerkbare grüne Fluoreszenz zeigen. Im Spektralapparat zeigen die Flüssigkeiten eine Bande im Grün, und daneben

---

[1]) *Hans Molisch*, Zwei neue Zuckerreaktionen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **19**. Ref. S. 746 (1886).

[2]) *C. Reichl*, Eine neue Klasse von Phenolfarbstoffen. *Dinglers* polytechn. Journ. Bd. 235. S. 232 (1880).

[3]) *Ihl*, Chemiker-Zeitung. Jg. 1885. S. 231; Jg. 1887. S. 2.

[4]) *Ladislaus v. Udranski*, Über Furfurolreaktionen I und III. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 355 u. 357 (1888); Bd. **13**. S. 248 (1889).

[5]) d. h. die CO enthaltenden Glykosen, s. über Aldosen, Ketosen etc. die Lehrbücher.

[6]) *B. Tollens* und *F. Rorive*, Über Farben- und Spektralreaktionen der Zuckerarten mit Naphtoresorzin und Salzsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **41**. S. 1783 (1908).

zeigt die von der Galaktose herrührende Flüssigkeit eine Bande im Gelb, deren Mitte auf der D-Linie liegt.

Diese Bande der Galaktose tritt nicht auf, wenn Fruktose zugleich gegenwärtig ist, und somit zeigt sie sich nicht bei Raffinose und Stachyose; sie tritt jedoch auf, wenn man vor dem Zusatz des Naphtoresorzin diese Zuckerarten mit konzentrierter Salzsäure und Wasser (1:1) eine halbe Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt, und die Flüssigkeit dann durch etwas Blutkohle und Filtration von den Zersetzungsprodukten der Fruktose befreit wird.

Die mit Naphtoresorzin entstandenen dunklen Substanzen sind im allgemeinen nicht in Äther löslich, doch bilden die aus Glukuronsäure (s. u.) entstehenden hiervon eine Ausnahme, denn sie lösen sich beim Schütteln der beim Kochen mit Salzsäure und Naphtoresorzin entstandenen trüben und schwärzlichen Flüssigkeit mit Äther und verleihen dem letzteren eine schön violettblaue Farbe.

Steensma[1]) hat versucht, die Farbenreaktionen der physiologischen Chemie von gemeinsamem Gesichtspunkte aus zu betrachten.

e) Polarisation.

Da die Zuckerarten die Ebene des polarisierten Lichtes bald nach rechts, bald nach links drehen, ist auch zur qualitativen Reaktion auf Zuckerarten die Anwendung des Polarisationsapparates von großem Nutzen (siehe später bei der quantitativen Bestimmung).

f) Reaktion der Benzoylierung. Baumann-Schottensche Reaktion.

Mit Benzoylchlorür und Natronlauge geben nach *Baumann*[2]) alle Zuckerarten beim Schütteln Niederschläge von Benzoaten, indem sich Chlornatrium bildet und Benzoyl an Stelle des Hydroxylwasserstoffes eintritt.

Die Gleichung:

$$C_6H_{12}O_6 + 5\,C_6H_5COCl + 5\,NaOH =$$
$$= C_6H_7O(C_6H_5.CO_2)_5 + 5\,NaCl + 5\,H_2O$$

oder mit auseinander geschriebener Glukoseformel:

$$\begin{array}{lll} CH_2OH & & CH_2O.COC_6H_5 \\ CHOH & & CHO.COC_6H_5 \\ CHOH + 5\,C_6H_5COCl & = & CHO.COC_6H_5 \quad + 5\,H_2O \\ CHOH + 5\,NaOH & & CHO.COC_6H_5 \quad + 5\,NaCl \\ CHOH & & CHO.COC_6H_5 \\ COH & & COH \end{array}$$

würde z. B. bei den Hexosen den Verlauf der Reaktion ausdrücken, wenn sie nicht umkehrbar wäre, oder weiter eine Reaktion zwischen dem Benzoat

[1]) *F. A. Steensma*, Die Farbenreaktionen in der Biochemie. Biochemische Zeitschr. Bd. 8. S. 203 (1908).

[2]) *E. Baumann*, Über eine einfache Methode der Darstellung von Benzoesäureäthern. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. 19. S. 3218 (1886).

des Zuckers und der Natronlauge einträte, durch welche der Hexose-Benzoesäure-Ester zum Teil wieder unter Bildung von Natriumbenzoat seiner Benzoesäure beraubt würde.[1])

Infolge dieser Störungen ist die Reaktion oft nicht erschöpfend, und es bilden sich hier statt des Penta-Benzoats oft das Tetra- oder Tri-Benzoat.[2])

Die Zucker-Benzoate sind fast oder ganz unlöslich in Wasser und ihre Bildung kann zum Nachweise, z. B. von Glukose im Harn, dienen (siehe dieses).

g) Reaktionen der Einzelgruppen der Glykosen.

1. Reaktionen auf Tetrosen.

Nur ganz kurz möge mitgeteilt werden, daß man wahrscheinlich auf die Gegenwart von Tetrosen schließen kann, wenn man beim Erhitzen der zu prüfenden Substanz mit Salzsäure oder Schwefelsäure und Ausschütteln der so erhaltenen Flüssigkeit Milchsäure erhält, welche sich vielleicht nach folgender Gleichung bilden kann:

$$\underset{\text{Tetrose}}{C_4H_8O_4} = \underset{\text{Milchsäure}}{C_3H_6O_3} + CH_2O$$

Wenigstens lassen einige von *Ellet* und *Tollens*[3]) angestellte Versuche dies vermuten.

2. Reaktionen der Pentosen und der Glukuronsäure.

α) Farbenreaktionen mit Phlorogluzin, Orzin, Naphtoresorzin.

Eine sehr schöne violettrote Färbung tritt auf, wenn man Spuren von Arabinose oder Xylose oder von Materialien, wie Kirschgummi, welche sie enthalten oder bei der Hydrolyse entstehen lassen, mit Salzsäure und Phloroglucin erhitzt, und dieselbe Färbung tritt auch beim Erhitzen von Glukuronsäure mit Phlorogluzin und Salzsäure auf. Diese Farbenreaktionen sind früher von *Ihl*[4]) bearbeitet; die Spektralreaktionen sind von *Tollens* mit *Wheeler*[5]) und *Allen*[6]) aufgefunden und untersucht, sie sind neuerdings von *Pinoff*[7]) genau studiert, und es ist

[1]) *Ludwig Kueny*, Über Benzoesäureester der Kohlenhydrate, des Glukosamins und einiger Glukoside. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **14**. S. 330 (1890).

[2]) *Zd. H. Skraup*, Benzoylverbindungen von Alkoholen, Phenolen und Zuckerarten. Sitzungsber. d. Wiener Akad. Naturw. Klasse. Bd. **98**. IIb. S. 438 (1889).

[3]) *W. B. Ellett* und *B. Tollens*, Über die Bestimmung der Methylpentosane neben den Pentosanen. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. 38. S. 499 (1905).

[4]) *Ihl*, Chemiker-Ztg. Jg. **1885**. S. 231.

[5]) *H. B. Wheeler* und *B. Tollens*, Über die Xylose oder den Holzzucker, eine zweite Pentaglykose. Ann. Chem. Vol. **254**. S. 304 (1889).

[6]) *E. W. Allen* und *B. Tollens*, Über Holzzucker (Xylose) und Holzgummi (Xylan). Ann. Chem. Vol. **260**. S. 289 (1890).

[7]) *E. Pinoff*, Studien über die *Tollens*sche Phlorogluzin-Salzsäurereaktion auf Pentosen. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. 38. S. 766 (1905).

von letzterem die Wellenlänge der beobachteten Absorptionsbanden bestimmt worden.

Man bringt in die zu prüfende Lösung eine hanf- bis erbsengroße Menge Phlorogluzin, setzt ein der Flüssigkeit gleiches Volum konzentrierter Salzsäure hinzu und erwärmt sehr langsam bis zum beginnenden Kochen. Allmählich tritt eine sehr schöne violettrote Färbung auf, welche sich nach und nach verstärkt. Nach einigen Minuten Stehens treten Trübung und dann Huminabscheidung ein. Bei Anwendung von Alkohol statt Wasser und Zusatz von etwas Äther bleibt, wie *Pinoff* fand, die Lösung tagelang klar.

Bringt man die klare schön violettrote Flüssigkeit vor den Spalt des Spektralapparates, so sieht man eine sehr schöne, ziemlich scharfe schwarze Absorptionsbande im Gelb des Spektrums zwischen den Linien D und E, also wenn, wie gewöhnlich, der Spektralapparat das violette Ende des Spektrums an der rechten Seite zeigt, rechts von der Natriumlinie.

Wenn die Lösung sich trübt, tritt allgemeine Verdunklung ein, und dies ist bei unreinen, Pentosen enthaltenden Flüssigkeiten, z. B. Harn, meist schon eingetreten, ehe sich die violettrote Farbe entwickelt hat, denn zahlreiche andere Stoffe, und so auch andere Glykosen, geben, sei es in der Kälte oder bei gelindem Erwärmen, mit Phlorogluzin und Salzsäure Gelb- und Braunfärbung und Trübung.

In diesen Fällen kann man nach *Salkowski*[1]) die zum Kochen gebrachte, dann erkaltete Flüssigkeit mit Amylalkohol schütteln, welcher den roten Farbstoff löst, sich beim Stehen oben abscheidet und die Beobachtung vor dem Spektralapparat zuweilen gestattet. Hierzu ist reiner Amylalkohol erforderlich, und Amylalkohol, welcher beim Zusammenbringen mit Salzsäure und Phlorogluzin erwärmt, auch ohne die Gegenwart von Pentosen verschiedene Spektralbanden gibt (s. auch *v. Udranski*), ist zu vermeiden.

Will man nicht Amylalkohol verwenden, so befolgt man die *Tollens*sche „Absatzmethode".[2])

Hierzu stellt man, wenn die oben besprochene Trübung, welche die Spektrumbeobachtung verhindert, eingetreten ist, die aufgekocht gewesene Flüssigkeit 3—5 Minuten zur Seite, kühlt unter einem Wasserhahn völlig ab, sammelt den dunklen Absatz, welcher beim Auswaschen violettlich wird, auf einem kleinen Schnellfilter, d. h. einem mit Filtrierpapier versehenen Trichterchen, dessen sehr enges Rohr 20—25 *cm* lang und, wie ein *Piccard*sches Filtrierrohr, zu einer Schleife gebogen ist. Man wäscht mit Wasser, bis das Waschwasser fast farblos ist, und gießt 95%igen Alkohol auf das Filter; das alkoholische Filtrat bringt man in dem Probierrohre an den Spalt

[1]) *E. Salkowski*, Über das Vorkommen von Pentosen im Harn. Chemiker-Zeitung. 1894. Rep. S. 237; Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **27**. S. 508 (1899).

[2]) *B. Tollens*, Über den Nachweis der Pentosen mittelst der Phlorogluzin-Salzsäuremethode. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **29**. S. 1202 (1896).

des Spektralapparates und gießt, falls sie zu dunkel ist, sehr vorsichtig Alkohol darauf, so daß sich hellere Zonen bilden, welche, falls Pentose vorhanden war, die dunkle Spektralbande gut zeigen.

Nicht nur die Pentosen zeigen diese Reaktionen, sondern auch die Glukuronsäure, und zwar sowohl das freie Glukuronsäurelakton (oder das Glukuron), als auch die sogenannten gepaarten Glukuronsäuren, wie Euxanthinsäure usw., aus denen beim Erhitzen mit Salzsäure die Glukuronsäure abgespalten wird (s. *de Chalmot, Mann, Lefèvre* und *Tollens* bei Glukuronsäure).

Ähnliche Reaktionen wie das Phlorogluzin gibt nach *Allen* und *Tollens*[1]) das Orzin mit den Pentosen und der Glukuronsäure, doch muß man nach der Absatzmethode verfahren.

Erhitzt man eine Lösung der genannten Stoffe mit ihrem Volum Salzsäure von 1·19 spezifischem Gewicht und einem Stückchen Orzin, so tritt nach einiger Zeit eine violettblaue Färbung auf, und die Flüssigkeit zeigt eine sehr kurze Zeit lang eine Spektralbande. Fast zugleich tritt jedoch eine bläuliche Trübung ein, und blaue Flocken scheiden sich ab. Wenn man, wie es genau bei den Phlorogluzinproben beschrieben ist, diesen „Absatz" nach einiger Zeit abfiltriert, auswäscht und in Alkohol löst, erhält man eine blaue Flüssigkeit, welche vor dem Spalt des Spektralapparates im Spektrum eine sehr schöne dunkle Bande liefert. Diese liegt jedoch nicht rechts von der Natriumlinie, sondern fast genau auf dieser.

Die Orzinreaktion auf Pentosen und Glukuronsäure ist von *Bial*[2]) verändert und empfindlicher gemacht worden, indem er sie bei Gegenwart von etwas Eisenchlorid anstellt.

Er wendet als „Orzinreagenz" eine mit 20 Tropfen Liq. ferri sesquichlor. versetzte Lösung von 1 *g* Orzin in 500 *cm*³ 30%iger Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·15) an, erwärmt ca. 4 *cm*³ dieser Flüssigkeit im Probierglase zum Sieden, entfernt von der Flamme und gibt einige Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit hinzu.

Sind Pentosen vorhanden, tritt sehr bald starke Grünfärbung ein; ist jedoch nur Glukuronsäure im Harn usw. enthalten, so findet dies nach *Bial* nicht statt.

Die *Bial*sche Reaktion ist von *Sachs*[3]) näher geprüft und im allgemeinen bestätigt worden. Es ist neben der Grünfärbung besonders auf den zwischen den *Fraunhofer*schen Linien C und D liegenden Absorptionsstreifen hingewiesen.

---

[1]) *E. W. Allen* und *B. Tollens*, Über Holzzucker (Xylose) und Holzgummi (Xylan). Ann. Chem. Vol. **260**. p. 305 (1890).

[2]) *Manfred Bial*, Bemerkungen zu der Arbeit von *F. Sachs*: „Farbenreaktionen der Pentosen." Biochem. Zeitschr. Bd. **3**. S. 323 (1907). — Die Diagnose der Pentosurie. Deutsche med. Wochenschr. Jg. 28. S. 253 (1902). — Über die Diagnose der Pentosurie mit dem von mir angegebenen Reagens. Ebenda. Jg. 29. S. 477 (1903).

[3]) *Fritz Sachs*, Über den Wert der verschiedenen Farbenreaktionen zum Nachweis der Pentosen. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 384 (1906).

Bei einer Nachprüfung der *Bial*schen Reaktion durch *Lefèvre* und *Tollens*[1]) hat sich ebenfalls gezeigt, daß die Pentosen gut auf die obige Weise angezeigt werden, während bei verdünnter Glukuronsäure die Grünfärbung nicht oder kaum eintritt.

Die Ursache dieses Nichteintretens ist, daß die Glukuronsäure sich langsamer zersetzt als die Pentosen, und daß sie in dem bald kälter werdenden Orzinreagenz nicht die Zeit hat, zu wirken. Erhitzt man länger, indem man die mit Glukuronsäure versetzte Flüssigkeit in ein kochendes Wasserbad bringt, so tritt auch mit Glukuronsäure die Reaktion ein.

Schneller als Glukuronsäure wirkt Arabinose und noch schneller die Xylose.

Die entstandenen grünen Flüssigkeiten zeigen, wenn man sie vor den Spalt des Spektralapparates bringt, zuerst eine dunkle Bande im Rot zwischen den Linien B und C und dann eine andere auf der Na- oder D-Linie.

Andere Farbenreaktionen sind von *Jolles*[2]) und von *Neumann* angegeben.[3])

Wie ich gefunden habe[4]), bietet zur Entdeckung von Glukuronsäure, besonders bei Gegenwart der Pentosen, eine Farben- und Spektralreaktion mit Naphtoresorzin ein gutes Mittel.

Arabinose, Xylose und Glukuronsäure geben beim Erhitzen mit Naphtoresorzin und Salzsäure dunkle Stoffe, von welchen die aus den Pentosen entstehenden in Äther unlöslich sind, die aus Glukuronsäure sich bildende Substanz dagegen sich in Äther löst. Diese Ätherlösung ist, wenn sie mit reiner Glukuronsäure entstanden ist, schön violettblau gefärbt, wenn Pentosen, andere Glykosen oder Stoffe des Harns gegenwärtig sind, ist die Farbe violett, rot, rotbraun; stets zeigt die Ätherlösung im Spektralapparate eine schmälere oder breitere Absorptionsbande, deren Mitte etwas rechts (dem Grün zugewandt) von der D-Linie liegt.

Man operiert am besten folgendermaßen:

Ein höchstens hirsekorngroßes Stückchen der auf Glukuronsäure zu prüfenden Substanzen übergießt man in einem ungefähr 16 *mm* weiten Probierrohr mit 5—6 cm^3 Wasser, setzt 1 cm^3 einer 1%igen alkoholischen Lösung von Naphtoresorzin und ein der Gesamtflüssigkeit gleiches Volum Salzsäure von 1·19 spezifischem Gewicht hinzu und erhitzt vorsichtig.

---

[1]) *K. U. Lefèvre* und *B. Tollens*, Untersuchungen über die Glukuronsäure, ihre quantitative Bestimmung und ihre Farbenreaktionen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 4520 (1907).

[2]) *Adolf Jolles*, Über den Nachweis der Pentosen im Harn. Biochem. Zeitschr. Bd. **2**. S. 243 (1907).

[3]) Man sehe hierüber in *Sachs'* Abhandlung nach.

[4]) *B. Tollens*, Über einen einfachen Nachweis der Glukuronsäure mittelst Naphtoresorzin, Salzsäure und Äther. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 41. S. 1788 (1908).

Nach dem Beginn des Kochens erhält man dies auf einer kleinen Flamme 1 Minute lang.

Die dunkel gewordene Flüssigkeit setzt man beiseite; nach 4 Minuten kühlt man sie durch Schütteln unter einem Wasserstrahl völlig ab, gießt ein ihr gleiches Volum Äther in das Probierrohr und schüttelt gründlich.

Nach dem Absitzen ist der Äther bei Anwesenheit von Glukuronsäure in der untersuchten Substanz blau oder violett gefärbt, und er zeigt sehr deutlich die Spektralbande an der Natriumlinie.

Wenn das Absitzen des Äthers langsam vor sich geht, und wenn sich eine dunkle Schicht an den Wänden des Probierrohres zeigt, setzt man einen oder einige Tropfen Alkohol zu.

Hat man mit Harn zu tun, so versetzt man 5—6 cm^3 desselben mit $^1/_2$—1 cm^3 der Naphtoresorzinlösung und dem der Flüssigkeit gleichen Volum konzentrierter Salzsäure, erhitzt usw.

Der Äther ist in diesem Falle mehr rot.

Man verdünnt mit Äther, bis die Bande an der D-Linie sich von der allgemeinen Beschattung des Spektrums trennt.

Die aus Arabinose, Xylose sowie anderen Zuckerarten entstandenen dunklen Substanzen scheiden sich zwischen dem Äther und der unteren Schicht ab.

Diese Naphtoresorzin-Glukuronsäurereaktion tritt nach *C. Tollens*[1]) mit vielen normalen Harnen und besonders stark nach dem Genuß von Chloral, Kampfer, Lysol, Phenolen usw. auf.

Ferner zeigen sie nach *B. Tollens*[2]) einige Pflanzensubstanzen, wie Fucus, Laminaria usw.

β) Furfurol-Destillationsmethode.

Im Gegensatz zu den Hexosen geben die Pentosen und die Glukuronsäure beim Erhitzen mit Salzsäure nicht Lävulinsäure (siehe unten) und Ameisensäure, sondern Furfurol:

$$\underset{\text{Pentose}}{C_5H_{10}O_5} = \underset{\text{Furfurol}}{C_5H_4O_2} + 3\,H_2O,$$

und aus der Glukuronsäure entsteht zugleich 1 Mol. Kohlensäure:

$$\underset{\substack{\text{Glukuronsäure-}\\ \text{Lakton}}}{C_6H_8O_6} = \underset{\text{Furfurol.}}{C_5H_4O_2} + 2\,H_2O + CO_2$$

Das entstandene Furfurol destilliert mit den Wasser- und Salzsäuredämpfen über und wird im Destillat mittelst essigsauren Anilins[3]) nachgewiesen, welches mit Furfurol in Berührung eine prächtige Rotfärbung zeigt; falls man einen Tropfen des Destillats auf ein mit essig-

[1]) *C. Tollens*, Der Nachweis von Glukuronsäure oder Glykuronsäure nach *B. Tollens* im menschlichen Urine. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56. S. 115 (1908).

[2]) *B. Tollens*, Über einen einfachen Nachweis der Glykuronsäure mittelst Naphtoresorzin, Salzsäure und Äther. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 41. S. 1788 (1908).

[3]) Siehe über die Bereitung S. 84.

saurem Anilin betupftes Papierstückchen fallen läßt, ist im Destillat Furfurol vorhanden, und dies ist aus den Pentosen usw. entstanden (siehe das Nähere bei den quantitativen Bestimmungen).

Man muß jedoch bedenken, daß nicht nur die Pentosen und Glukuronsäure Furfurol liefern, sondern auch geringe Mengen Furfurol aus anderen Stoffen bei der Destillation mit Salzsäure entstehen, und zwar liefern auch die Hexosen (Glukose, Galaktose etc., auch Stärke), wenn auch geringe, doch merkliche Mengen Furfurol, und dasselbe ist, wie es besonders von *Cross* und *Bevan*[1]) hervorgehoben wird, der Fall mit natürlicher und durch Oxydation gewonnener Oxyzellulose, so daß *Cross* und *Bevan*, die das Furfurol liefernden Stoffe als Furfuroide oder Furoide zusammenfassen. Da jedoch bei den meisten Naturprodukten das Furfurol ganz oder fast ganz von den sehr verbreiteten Pentosen oder ihren Muttersubstanzen, den Pentosanen, geliefert wird, so spricht man fast allgemein von der Pentosen- oder Pentosanenreaktion.

Der Furfuroldestillation kann man die rohen Pflanzen- oder Tiersubstanzen unterwerfen, man kann aber auch die durch Hydrolyse der Rohmaterialien erhaltenen Sirupe auf diese Weise prüfen.

Man benutzt zur Furfuroldestillation den bei den quantitativen Bestimmungen beschriebenen Apparat (siehe unten).

Wenn nun die Gegenwart von Pentosen etc. konstatiert ist und man erfahren will, welche der genannten Stoffe vorhanden sind, ist natürlich das Sicherste die Abscheidung der reinen Stoffe und Untersuchung derselben.

Da dies in zahlreichen Fällen nicht möglich ist, muß man Spezialreaktionen anwenden.

γ) Arabinose.

Die Arabinose weist man durch Fällung der Sirupe mit Bromphenylhydrazin[2]), Methylphenylhydrazin, Benzylphenylhydrazin[3]) oder am besten Diphenylhydrazin[4]) *(Neuberg)* nach, dies liefert mit l-Arabinose ein sehr schwer lösliches, nach *Tollens* und *Müther*[5]), *Maurenbrecher*[6]) und anderen bei 204—205° schmelzendes Hydrazon.

[1]) *C. F. Cross, E. J. Bevan* und *Claud Smith,* Über einige chemische Vorgänge in der Gerstenpflanze und *A. Schöne* und *B. Tollens,* Über die Gärung der Pentosen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 28. S. 2604 (1895). — Siehe auch Journ. f. Landwirtsch. Jg. **1901**. S. 39. Anm.

[2]) *Emil Fischer,* Über einige Osazone und Hydrazone der Zuckergruppe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **27**. S. 2490 (1894).

[3]) *Otto Ruff* und *Gerhard Ollendorf*, Verfahren zur Reindarstellung und Trennung von Zuckern. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 3234 (1899).

[4]) *Carl Neuberg*, Über die Harnpentose, ein optisch inaktives, natürlich vorkommendes Kohlehydrat. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **33**. S. 2243 (1900); Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 35. S. 38 (1902).

[5]) *A. Müther* und *B. Tollens*, Über einige Hydrazone und ihre Schmelzpunkte. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **37**. S. 312 (1904).

[6]) *B. Tollens* und *A. D. Maurenbrecher*, Über die Diphenylhydrazone der l-Arabinose und der Xylose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **38**. S. 500 (1905).

In den Filtraten von Arabinose-Hydrazonen sucht man dann die Xylose auf, deren Hydrazone im allgemeinen leichter löslich sind als diejenigen der Arabinose.

δ) Xylose. *Bertrands* Reaktion.

Charakteristisch für Xylose ist die *Bertrand*sche[1]) Reaktion mit Brom und Cadmiumkarbonat. Sie beruht darauf, daß Xylose von Brom in Xylonsäure verwandelt wird, und daß das Cadmiumsalz der Xylonsäure mit Bromcadmium ein schwer lösliches kristallisiertes Doppelsalz, $(C_5H_9O_6)_2Cd + CdBr_2 + 2H_2O$, bildet, während mit Arabinose nichts Analoges zu erhalten ist.

Die Reaktion wird nach *Widtsoe* und *Tollens*[2]) am besten folgendermaßen angestellt: 0·2 *g* Xylose oder die doppelte Menge des zu untersuchenden Sirups, 1 cm^3 Wasser, 0·25 *g* (oder 7 bis 8 Tropfen) Brom und 0·5 *g* Cadmiumkarbonat werden in einem Probierglase unter ganz gelinder Erwärmung zusammengeschüttelt, dann wird das lose verkorkte Glas beiseite gesetzt; am folgenden Tage wird der Inhalt in einem Schälchen fast eingetrocknet, darauf in 4—5 cm^3 Wasser gelöst, filtriert, wieder fast eingetrocknet und mit 1 cm^3 Alkohol versetzt. Wenn reine Xylose vorhanden war, setzen sich bald Kristalle ab, welche unter dem Mikroskop nadelig oder wetzsteinförmig sind; bei Gegenwart vieler anderer Stoffe dauert dies länger.

Es ist u. a. *Hauers* und *Tollens*[3]) gelungen, durch Benzylphenylhydrazin aus den alkoholischen Lösungen der Sirupe von der Hydrolyse von Gummiarten erst Arabinose-Benzylphenylhydrazon zu fällen und im Filtrat hiervon durch Zusatz von Wasser Xylose-Benzylphenylhydrazon nachzuweisen.

ε) Glukuronsäure.

Die im Harn, besonders nach Eingabe von Chloral, Kampfer, Menthol etc., auftretenden gepaarten Glukuronsäuren bringen die oben beschriebenen Farbenreaktionen der Glukuronsäure mit Phlorogluzin und Orzin und besonders die schöne, einfache und leicht auszuführende Reaktion mit Naphtoresorzin (s. *B. Tollens* und *C. Tollens* bei den Naphtoresorzin-Farbenreaktionen S. 97, 98) hervor, welch letztere mit den Pentosen nicht eintritt.

Ferner bewirken die gepaarten Glukuronsäuren Linksdrehung der Ebene des polarisierten Lichtes, während die freie Glukuronsäure rechtsdrehend ist.

---

[1]) *M. G. Bertrand*, Recherches sur quelques dérivés du xylose. Bull. Soc. chim. [3.] T. 5. p. 546, 554 (1891).

[2]) *J. A. Widtsoe* und *B. Tollens*, Über Arabinose, Xylose und Fukose aus Traganth. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **33**. S. 136 (1900).

[3]) *R. Hauers* und *B. Tollens*, Über die Hydrolyse pentosanhaltender Stoffe mittelst verdünnter Säuren und mittelst Sulfitflüssigkeit sowie über die Isolierung der Pentosen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 3313 (1903).

P. Mayer[1]) hat hierauf besonders hingewiesen; er polarisiert den (eventuell mit Bleizucker geklärten) Harn, erhitzt ihn dann mit Schwefelsäure und polarisiert wieder. Ursprüngliche Rechtsdrehung und nach der Inversion Linksdrehung deuten also auf die Gegenwart von Glukuronsäure.

Die Nachweisung der Glukuronsäure durch Phenylhydrazin ist nicht gut möglich, weil die entstehenden Niederschläge wechselnde Zusammensetzung und verschiedene Schmelzpunkte (von 114° bis zu 217°) zeigen können *(P. Mayer)*.

Dagegen ist das p-Bromphenylhydrazin brauchbar, denn mit diesem bildet die Glukuronsäure nach *Neuberg*[2]) einen einheitlichen Niederschlag, $C_{12}H_{17}O_7N_2Br$, welcher aus gelben Kristallen besteht. Diese schmelzen als Rohprodukt bei 200—206° und nach dem Umkristallisieren aus 60%igem Alkohol bei 236°. Sie drehen sehr stark links.

Man erhitzt die auf Glukuronsäure zu prüfende Lösung mit etwas einer siedend heißen Lösung von 5 *g* salzsaurem p-Bromphenylhydrazin und 6 *g* Natriumacetat im Wasserbade auf 60° C. Die Mischung wird erst klar, scheidet jedoch nach 5 bis 10 Minuten gelbe Nadeln ab. Man läßt erkalten, filtriert die vermehrten Kristalle ab und erhitzt das Filtrat von neuem, wodurch neue Kristalle entstehen, welche man abfiltriert, erhitzt dann wieder usw.

Die auf einem Filter gesammelten Kristalle wäscht man gründlich mit warmem Wasser und dann mit absolutem Alkohol. Sie schmelzen dann bei 200 bis 216° und nach dem Umkristallisieren aus 60%igem Alkohol bei 236°. 0·2 *g* der Kristalle geben in 6 cm^3 absolutem Alkohol und 4 cm^3 Pyridin gelöst im 100 *mm*-Rohr und im Natriumlicht im *Laurent*schen oder im *Lippich*schen Halbschattenapparat eine Linksdrehung von 7·42°, was annähernd einer spezifischen Drehung $(\alpha)D = -369°$ entspricht.

Neuberg hat auf diese Weise im normalen Harn nach verschiedenen Operationen mit Bleiacetaten usw. schließlich Glukuronsäure nachgewiesen.

Auch *Hervieux*[3]) hat im Harn nach verschiedenen umständlichen Operationen schließlich mit p-Bromphenylhydrazon Glukuronsäure nachgewiesen.

Bial[4]) hat in der Galle von Hunden nach Eingabe von Menthol die Mentholglukuronsäure nachgewiesen, indem er die verdünnte Galle mit

[1]) *P. Mayer* und *C. Neuberg*, Über den Nachweis gepaarter Glukuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn. Berlin. klin. Wochenschrift. Jg. **1899**. Nr. 27 u. 28. S. 591, 617. — Siehe auch *P. Mayer* und *Neuberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 256 (1900).

[2]) *Carl Neuberg*, Über eine Verbindung der Glukuronsäure mit p-Bromphenylhydrazin. Über Löslichkeitsverhältnisse von Osazonen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 2395 (1899). — Zeitschr. f. physiol. Chem. Jg. **29**. S. 261 (1900).

[3]) *Hervieux*, Bull. soc. chim. (4). T. **4**. p. 349 (1908).

[4]) *Manfred Bial*, Über den Befund gepaarter Glukuronsäuren in der Galle. Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 260 (1905).

Bleizucker fällte, dann aus dem Filtrat mit Bleiessig die Mentholglukuronsäure fällte und diesen Niederschlag mit 4%iger Schwefelsäure zersetzte, darauf hat er das Filtrat $1^1/_2$ Stunden am Rückflußkühler gekocht und aus der neutralisierten Flüssigkeit mit p-Bromphenylhydrazin die Glukuronsäure nachgewiesen.

In einigen Fällen, so bei der Phenolglukuronsäure[1]) und auch bei der Mentholglukuronsäure[2]) und der Euxanthinsäure gelingt nach *Neuberg* und *Neimann*[3]) der Nachweis der Glukuronsäure durch Überführung in Zuckersäure mittelst Brom:

$$\underset{\text{Glukuronsäurelakton}}{C_6H_8O_6} + 2Br + H_2O = \underset{\text{Zuckerlaktonsäure.}}{C_6H_8O_7} + 2HBr.$$

Man erhitzt die vorher aus dem Harn mittelst Bleiessigfällung, Zerlegung des Bleiessigniederschlages durch Schwefelwasserstoff, Abdampfen und Kristallisieren dargestellte Phenolglukuronsäure mit Bromwasserstoff und Brom und isoliert die so gewonnene Zuckersäure zuerst als basisches Baryumsalz und dann mittelst ihres Silbersalzes.

3. Reaktionen der Methylpentosen.

Analog den Pentosen, welche beim Destillieren mit Salzsäure Furfurol liefern, geben die Methylpentosen (Rhamnose, Fukose, Rhodeose) bei dem gleichen Verfahren Methylfurfurol

$$\underset{\text{Rhamnose}}{C_5H_9(CH_3)O_5} = \underset{\text{Methylfurfurol.}}{C_5H_3(CH_3)O_2} + 3H_2O$$

Wenn man mit Salzsäure von 1·06 spez. Gew. destilliert und einen Tropfen des Destillates auf Papier mit essigsaurem Anilin fallen läßt, erhält man nicht die schöne rote Reaktion des Furfurols, wohl aber eine viel weniger auffallende gelbliche Färbung, welche, falls Furfurol (aus Pentosen oder Pentosanen, welche der Methylpentose beigemengt sind) gleichzeitig vorhanden ist, völlig durch die rote Reaktion verdeckt wird.

Man kann aber das Methylfurfurol leicht nachweisen, indem man nach *Maquenne*[4]) Alkohol und Schwefelsäure, welche es grün färben, darauf wirken läßt, oder besser, indem man nach *Widtsoe* und *Tollens*[5]) einige Kubikzentimeter des Salzsäuredestillates mit ihrem gleichen Volum konzentrierter Salzsäure gelinde erwärmt, wobei sich die Flüssigkeit gelb färbt.

Oder man operiert nach *Oshima* und *Tollens*[6]) mit einem Zusatz von Phlorogluzin, wodurch die Reaktion empfindlicher wird.

---

[1]) *E. Salkowski* und *C. Neuberg*, Zur Kenntnis der Phenolglukuronsäure. Biochemische Zeitschr. Bd. **2**. S. 307 (1907).

[2]) *Carl Neuberg*, Zur Bestimmung der Glukuronsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 184 (1905).

[3]) *Carl Neuberg* und *Wilhelm Neimann*, Quantitative Bestimmung gepaarter Glukuronsäuren IX. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44** S. 127 (1905).

[4]) *M. Maquenne*, Recherches sur le fucusol. Compt. rend. Bd. **109**. p. 573 (1889).

[5]) *J. A. Widtsoe* und *B. Tollens*, Über Arabinose, Xylose und Fukose aus Traganth. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **33**. S. 146 (1900).

[6]) *Kintaro Oshima* und *B. Tollens*, Über Spektralreaktionen des Methylfurfurols. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **34**. S. 1425 (1901).

Man setzt zu 5 cm^3 des Salzsäuredestillates 5 cm^3 konzentrierte Salzsäure, bringt etwas einer Lösung von Phlorogluzin in Salzsäure von 1·06 spez. Gew. hinzu und filtriert die bei Gegenwart von Furfurol grünschwarz gewordene Flüssigkeit nach 5 Minuten; bei Gegenwart von Methylfurfurol ist das Filtrat gelb bis rotgelb.

Dieses Filtrat sowie die nach *Widtsoe* und *Tollens* erhaltene gelbe Flüssigkeit geben vor dem Spalte des Spektralapparates eine deutlich sichtbare dunkle Bande zwischen Grün und Blau, neben welcher bei passender Verdünnung das Blau oder Violett noch deutlich zu sehen ist.

4. Prüfung auf Hexosengruppen (Lävulinsäurereaktion).

Zur Prüfung darauf, ob die aus Naturprodukten gewonnenen Stoffe zu der Hexosengruppe, also zu den Kohlenhydraten, aus welchen hydrolytisch Hexosen oder die reduzierenden Zuckerarten mit 6 Atomen Kohlenstoff entstehen, gehören, dient der Versuch, ob sie beim Erhitzen mit ziemlich konzentrierter Salzsäure Lävulinsäure oder Acetopropionsäure, $C_5H_8O_3$, entstehen lassen.

Diese Säure entsteht, wie ich mit *v. Grote* [1]), *Kehrer* und besonders *Wehmer* [2]) nachgewiesen habe, auf die obige Weise aus allen bekannten Hexosen, und ferner entsteht sie aus allen Di- oder Polysacchariden, welche bei der Hydrolyse Hexosen liefern, sowie nach *Kossel* [3]) aus Nukleinsäure, z. B. der Adenylsäure aus der Thymusdrüse und der Nukleinsäure aus der Knorpelsubstanz, und nach *Inouye* [4]) aus anderen Nukleinsäuren, dagegen entsteht sie nicht aus Körpern wie Mannit, den Saccharinen, und auch nicht aus den Pentosen (s. o.), und ihr Vorhandensein in der durch Erhitzen mit Salzsäure erhaltenen Flüssigkeit beweist die Existenz von Hexosegruppen in der untersuchten Substanz, denn seltenere Verbindungen anderer Art, aus welchen Lävulinsäure entsteht, sind in vegetabilischen und animalischen Stoffen bis jetzt nicht gefunden.

Die Konstatierung der Gegenwart von Lävulinsäure geschieht durch Extraktion der Flüssigkeit mit Äther und Überführung der Säure in das zu isolierende Silbersalz.

Um die Reaktion auszuführen, erhitzt man 5—10 *g* der betreffenden Substanzen in mit Kautschukstopfen und aufgesetztem Kühlrohr versehenem Kolben mit 20—50 cm^3 Salzsäure von 1·09—1·10 spez. Gew. (18—20% HCl)

[1]) *A. v. Grote, E. Kehrer* und *B. Tollens,* Untersuchungen über die Lävulinsäure oder β-Acetopropionsäure. I. Über Darstellung und Eigenschaften der Lävulinsäure. II. Über die Bildung von Lävulinsäure aus verschiedenen Kohlenhydraten. Ann. Chem. Vol. **206**. p. 207, 226 (1881).

[2]) *C. Wehmer* und *B. Tollens,* Über die Bildung von Lävulinsäure, eine Reaktion aller wahren Kohlenhydrate. Ann. Chem. Vol. **243**. p. 314 (1888); siehe auch Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **33**. S. 1286 (1900).

[3]) *A. Kossel* und *Albert Neumann,* Darstellung und Spaltungsprodukte der Nukleinsäure (Adenylsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **27**. S. 2220 (1894).

[4]) *Katsuji Inouye,* Über das Vorkommen einer Lävulinsäure bildenden Atomgruppe in Nukleinsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **42**. S. 117 (1904).

im kochenden Wasserbade 5—20 Stunden lang, bis starke Huminabscheidung eingetreten ist. Dann saugt man die braune Flüssigkeit vom Niederschlage ab, schüttelt sie 4mal mit Äther aus, verdampft den durch ein trockenes Filter passierten Schütteläther in einem Becherglase oder destilliert ihn ab und bewahrt den in ein Schälchen gegossenen Rückstand in gelinder Wärme, um die gleichzeitig entstandene Ameisensäure zu verjagen.

Wenn Lävulinsäure vorhanden ist, gibt ein in Wasser gelöster Tropfen des Sirups auf Zusatz von Natron und Jod in der Kälte eine erhebliche Ausscheidung von Jodoform und Jodoformgeruch.

Man kocht jetzt den in Wasser gelösten Sirup mit etwas überschüssigem Zinkoxyd (Zinkweiß) und nachher etwas Blutkohle, filtriert und dunstet ein. Das lävulinsaure Zink kristallisiert leicht; man saugt es auf Papier oder in einem Trichter mit Filtrierplatte ab, bringt wenig absoluten Alkohol und dann Äther darauf, saugt wieder und wandelt dann das meistens hell gewordene Zinksalz in Silbersalz um. Zu diesem Zwecke löst man es in 5—10 cm^3 Wasser, indem man gelinde erwärmt, setzt etwas mehr als die äquivalente Menge Silbernitrat zu, erwärmt unter eventuellem Zusatz von Wasser zum annähernden Kochen, bis das zuerst ausgeschiedene Salz sich wieder gelöst hat, setzt wenig Blutkohle zu und filtriert.

Das Silbersalz, $C_5 H_7 O_3 . Ag$, scheidet sich bald ab und zeigt unter dem Mikroskop, falls es rein ist, zahllose schöne Sechsecke oder auch Täfelchen; in weniger reinem Zustande federartige Kristalle. Es wird abgesogen, mit kaltem Wasser gewaschen, zwischen Papier gepreßt und im Dunkeln über Schwefelsäure getrocknet. Beim starken Glühen im Porzellantiegel muß es nahezu 48·40% Silber hinterlassen.

Aus Pseudomucin hat *Otori*[1]) Lävulinsäure erhalten, indem er es auf dem Wasserbade mit einem Gemisch von 2 Gewichtsteilen Wasser und 1 Gewichtsteil konzentrierter Schwefelsäure löste und dann die Flüssigkeit am Rückflußkühler 12 Stunden kochte. Dann wurde filtriert, mit Äther extrahiert usw. (Siehe auch *Levene*.[2]))

5. Einzelreaktionen der Hexosen.

α) Reaktion auf Glukose und Glukosegruppen (Zuckersäurereaktion).

Wie *Sohst* und *Tollens*[3]) gezeigt haben, erhält man aus Glukose und aus Stärke beim Abdampfen mit Salpetersäure von 1·15 spez. Gew. Zuckersäure, welche mit Leichtigkeit in Gestalt ihres Monokaliumsalzes, $C_6 H_9 O_8 . K$, abzuscheiden ist. Von *Gans* und *Tollens*[4]) ist dies zu

[1]) *J. Otori*, Die Spaltung des Pseudomucins durch starke siedende Säuren. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **42**. S. 455 (1904).

[2]) *P. A. Levene*, Darstellung und Analyse einiger Nukleinsäuren. VII. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 199 (1904/1905).

[3]) *O. Sohst* und *B. Tollens*, Über kristallisierte Zuckersäure (Zuckerlactonsäure). Ann. Chem. Vol. **245**. p. 1 (1888).

[4]) *R. Gans* und *B. Tollens*, Über die Bildung von Zuckersäure als Reaktion auf Dextrose. Raffinose enthält Dextrose. Ann. Chem. Vol. **249**. p. 217 (1888).

einer Methode der Nachweisung von Glukosegruppen ausgearbeitet worden.

Kohlenhydrate, welche man auf Glukosegruppen untersuchen will, werden mit Salpetersäure abgedampft, der Rückstand wird in Monokaliumsalz übergeführt, dies wird gewogen und in Silbersalz verwandelt, welches durch die Analyse als solches identifiziert wird.

Galaktose, Fruktose, die Pentosen usw. geben auf diese Weise keine Zuckersäure, aus Gulose und aus Glukuronsäure kann sie dagegen ebenfalls entstehen, was zu bedenken ist.[1]

5 *g* der auf Glukosegruppen zu prüfenden Stoffe werden mit 30 cm^3 Salpetersäure von 1·15 spez. Gew. in einer Porzellanschale auf dem kochenden Wasserbade unter Umrühren zum Sirup verdampft, bis die Entwicklung von roten Dämpfen aufhört und der erst farblose Sirup eben anfängt, deutlich und dauernd gelb zu werden.

Dann wird er sogleich in wenig Wasser gelöst und, während man ihn durch eine kleine Flamme erhitzt, so lange mit gepulvertem kohlensauren Kalium verrührt, bis eine Probe der braun gewordenen Masse auf befeuchtetem roten Lackmuspapier eine deutliche Blaufärbung hervorbringt, bis also alle etwa vorhandene Zucker-Laktonsäure in Di-Kaliumsalz übergeführt ist. Jetzt setzt man Eisessig hinzu, bis die Masse stark nach Essigsäure riecht.

Bald wird die Masse durch Ausscheidung des Monokaliumsalzes dick, und jedenfalls tritt dies nach gelindem Verdunsten ein.

Am folgenden Tage bringt man das Salz auf Ton oder saugt es ab, worauf es in möglichst wenig Wasser heiß gelöst und umkristallisiert und von der meist vorhandenen Oxalsäure befreit wird. Nochmaliges Umkristallisieren mit Blutkohle vollendet die Reinigung.

Das getrocknete Salz wird dann gewogen, in nicht zu viel Wasser unter sehr vorsichtigem Zusatz von Ammoniak zur Neutralisation gelöst und in eine kalte Lösung von dem $1^1/_2$fachen Gewicht des Kaliumsalzes an Silbernitrat gegossen.

Das ausgefallene zuckersaure Silber, $C_6 H_8 O_8 Ag_2$, wird nach gutem Zerrühren und einigem Stehen abfiltriert, ausgewaschen, ausgepreßt und im Dunkeln über Schwefelsäure getrocknet. Es wird im Porzellantiegel stark geglüht und enthält nahezu 50·94% Ag.

Aus 5 *g* Glukose haben wir 1·5 bis 2 *g* reines Mono-Kalium-Saccharat erhalten.

Zur Auffindung von Glukose in Pflanzensäften, im Harn usw. wird man zuerst die Reaktion mit *Fehling*scher Lösung (siehe oben und einen anderen Abschnitt dieses Handbuchs), *Nylander*scher Lösung oder einer ähnlichen ausführen, ferner die Polarisation der geklärten Flüssigkeiten untersuchen (siehe unter quantitative Bestimmungen), darauf aber vielleicht noch eine der folgenden Prüfungen anstellen.

[1]) *Emil Fischer* und *Oscar Piloty*, Reduktion der Zuckersäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **24**. S. 527 (1891); s. a. *Neuberg* und *Neimann*, l. c. bei Glukuronsäure.

Als Reaktion auf Glukose wird von *Penzoldt* und *E. Fischer*[1]) eine beim Zusammenbringen der Zuckerlösung oder von diabetischem Harn mit Diazobenzolsulfosäure (aus Sulfanilsäure), etwas Alkali und Natriumamalgam nach ungefähr 10 Minuten auftretende rote Färbung mit violettem Ton empfohlen. Diese Färbung tritt mit allen Aldehyden auf; ob sie mit anderen Zuckerarten sich zeigt, ist nicht angegeben; ihr Spektrum bietet nach *Petri*[2]) eine scharfe Absorptionsbande im Grün und zwei andere unbestimmte Banden.

Zur Auffindung von Glukose im Harn empfiehlt *Hirschl*[3]) warm die *E. Fischer*sche Phenylhydrazinprobe.

Zu 6—8 *cm*³ Harn, welche sich in einem Probierrohr befinden, setzt man 2 Messerspitzen (also wohl 0·2—0·3 *g*) salzsaures Phenylhydrazin und 3 Messerspitzen essigsaures Natron, bringt das Rohr in ein siedendes Wasserbad, setzt, falls sich die Salze beim Erwärmen nicht ganz lösen, noch etwas Wasser hinzu und setzt das Probierrohr nach 20 bis 30 Minuten aus dem heißen Wasserbade in kaltes Wasser. Wenn eine nur einigermaßen erhebliche Menge Glukose vorhanden war, entsteht sofort ein gelber kristallinischer Niederschlag, und dieser zeigt unter dem Mikroskop gelbe, teils einzeln, teils in Drusen befindliche Nadeln. Gelbe Plättchen oder Kügelchen sind nicht beweisend.

Man soll 0·03% Glukose im Harn auf diese Weise auffinden können, und in Wasser soll nach *Hirschl* 0·003% Glukose noch zu entdecken sein.

Wenn die Flüssigkeiten, welche auf Glukose zu untersuchen sind, sehr wenig Zucker oder sehr viel Beimengungen enthalten, muß man suchen, den Zucker auf irgend eine Weise zu konzentrieren oder aber eine Vorreinigung eintreten zu lassen.

Z. B. kann man den im normalen Harn befindlichen „physiologischen Zucker" nach *Seegen*[4]) erst dann mit Sicherheit nachweisen, wenn man den Harn mit Knochenkohle erwärmt (wobei die letztere etwas Zucker adsorbiert), dann die Kohle abfiltriert, mit Wasser erwärmt und diese wieder abfiltrierte Lösung prüft.

Eine andere Methode der Konzentrierung ist das Versetzen des Harnes mit Alkohol und etwas Kaliumhydroxydlösung; hierdurch wird Zuckerkali als Sirup, der sich der Glaswand ansetzt, gefällt; man läßt einige Stunden absitzen, dekantiert, löst den Absatz in Wasser und prüft auf Glukose.[5])

---

[1]) *F. Penzoldt* und *Emil Fischer*, Neue Reaktion der Aldehyde. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **16**. S. 657 (1883).

[2]) *Petri*, Zum Verhalten der Aldehyde, des Traubenzuckers, der Peptone, der Eiweißkörper und des Acetons gegen Diazobenzolsulfonsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **8**. S. 293 (1883/1884).

[3]) *Josef Adolf Hirschl*, Über den Wert der Phenylhydrazinzuckerprobe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **14**. S. 377 (1890).

[4]) *J. Seegen*, Zur qualitativen Prüfung des Urins auf Zucker. Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. **11**. S. 355 (1872).

[5]) Siehe *W. Kühne*, Lehrbuch d. physiol. Chem. Leipzig. Jg. **1868**. S. 516.

Man kann auch den Harn durch Fällung mit neutralem Bleiacetat (Bleizucker) reinigen und das Filtrat vom Bleiniederschlag mit basisch-essigsaurem Blei (Bleiessig) und etwas Ammoniak versetzen, wodurch der Zucker (nebst der Glukuronsäure) *(P. Mayer, Tollens)* gefällt wird. Man filtriert, zersetzt den Filterinhalt durch Schütteln mit Wasser und Einleiten von Schwefelwasserstoff, filtriert vom Schwefelblei und prüft auf Glykosen (siehe Inosit).

Brauchbar ist ferner die *Baumann*sche Reaktion des Benzoylierens (siehe S. 93), indem sehr geringe Mengen Zucker beim Schütteln der Flüssigkeiten mit Benzoylchlorid und Natronlauge ausgefällt werden. So erhielt *Baumann*[1]) aus einer Lösung von 1—2 *mg* Glukose in 100 *cm*³ Wasser beim Schütteln mit 2 *cm*³ Benzoylchlorid und Natronlauge (wohl 10⁰/₀iger) einen sehr bemerkbaren flockigen Niederschlag.

Nach *v. Udranski* und *Baumann*[2]) zeigen die durch Schütteln von verdünnten Glukoselösungen mit Benzoylchlorid und Natronlauge erhaltenen Niederschläge beim Zusammenbringen mit α-Naphtol und konzentrierter Schwefelsäure die rote Reaktion der Kohlenhydrate.

β) Reaktionen der Mannose.

Die Mannose zeigt die sämtlichen Reaktionen der Glykosen, also die Gelbfärbung mit Natronlauge, die Reduktionserscheinungen mit alkalischen Metallösungen, die Lävulinsäurereaktion, die Farbenreaktion mit α-Naphtol und Schwefelsäure, aber im Verhalten zu essigsaurem Phenylhydrazin zeigt sie die große Differenz von den übrigen Glykosen, daß ihr Phenylhydrazon im Wasser sehr schwer löslich ist und sich nach einiger Zeit in der Kälte und schnell bei 30—35° abscheidet.

Man setzt also der zu prüfenden neutralen, nicht zu konzentrierten Flüssigkeit etwas einer Lösung von 5 Tropfen Phenylhydrin und 3 Tropfen Essigsäure in zirka 1—2 *cm*³ Wasser zu und läßt in gelinder Wärme stehen.

Ist innerhalb einiger Stunden kein Niederschlag entstanden, so ist Mannose nicht vorhanden.

Ein entstandener Niederschlag wird nach *Storer*[3]) nach dem Abgießen, Absaugen oder Abfiltrieren der überstehenden Flüssigkeit mit einer Mischung von 3—4 Mol. starkem Alkohol und 1 Volum Wasser erwärmt, worauf der ursprünglich zum Teil unter dem Mikroskop in Kügelchen erschienene Niederschlag deutliche mikroskopische prismatische Kristalle zeigen muß. Ferner bestimmt man den Schmelzpunkt, welcher bei umkristallisiertem Mannose-Phenylhydrazon nahe 185° sein muß.

[1]) *E. Baumann*, Über eine einfache Methode der Darstellung von Benzoesäureäther. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **19**. S. 3218 (1886).

[2]) *L. v. Udranski* und *E. Baumann*, Das Benzoylchlorid als Reagens. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **21**. S. 2744 (1888).

[3]) *Storer*, Testing for Mannose. Bulletin of the Bussey Institution in Jamaica Plain (Boston). Vol. **3**. Part. II. p. 13 (1902). Chem. Zentralbl. Jg. **1902**. II. S. 1155.

Aus einem durch Hydrolyse von Hefegummi erhaltenen Sirup hat *Oshima* [1]), nachdem in verdünnter Lösung nichts zu erhalten war, durch Mischung von 2 *g* Sirup, 2 *g* Wasser und 1 *g* Phenylhydrazin eine erhebliche Füllung von Mannose-Phenylosazon bekommen.

γ) Reaktionen der Fruktose.

Wie *Seliwanoff* [2]) fand, tritt beim gelinden Erwärmen von selbst verdünnten Lösungen von freier Fruktose oder von Fruktose enthaltenden Zuckern, wie Rohrzucker, mit Resorzin und Salzsäure eine schöne, lebhaft rote Färbung ein, welche charakteristisch ist.

Man vermischt am besten die in einem Probierglase befindliche Zuckerlösung mit $^1/_4$ ihres Volums an konzentrierter Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·19), setzt eine hanfkorngroße Menge Resorzin hinzu und erwärmt sehr allmählich auf kleiner Flamme. [3]) Bald tritt die rote Farbe auf, welche nicht violettrot (wie die Pentosenreaktion mit Phlorogluzin), sondern mehr feuerrot ist, und sich im Laufe einiger Minuten entwickelt. Nach einiger Zeit trübt sich die Flüssigkeit, wird grau und undurchsichtig und setzt Humin ab.

Bringt man die rote Flüssigkeit vor den Spalt des Spektralapparates, so zeigt sich neben Verdunkelungen im roten und violetten Teil des Spektrums zwischen Grün und Blau eine zwar nicht schöne, aber doch sichtbare dunkle Bande.

Dieselbe Reaktion tritt auch bei Gegenwart von Sorbose und anderen. die Ketogruppe. CO. enthaltenden künstlich dargestellten Zuckern auf. so daß sie, wie *Neuberg* [4]) hervorhebt, eine Reaktion auf Keto-Hexosen ist.

Wenn man nicht, wie oben angegeben ist, nur $^1/_4$ Volum der Lösungen der obigen Zucker an konzentrierter Salzsäure, sondern ein gleiches Volum hinzusetzt, so tritt zwar die Fruktoserotfärbung sehr schön auf, aber andere Zuckerarten, so Glukose, geben dann oft auch Spuren von Rotfärbung, so daß man hierdurch leicht getäuscht werden kann, denn wenn man Glukoselösungen mit Resorzin und mit konzentrierter Salzsäure erhitzt, tritt zwar nicht starke, aber doch deutliche Rotfärbung auf [5]), und *Rosin* [6])

---

[1]) *K. Oshima*, Über Hefegummi und Invertin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 42 (1902).

[2]) *Theodor Seliwanoff*, Notiz über eine Fruchtzuckerreaktion. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **20**. S. 181 (1887).

[3]) *Tollens*, Kurzes Handb. d. Kohlenhydrate. II. S. 132.

[4]) *Carl Neuberg*, Über die Farbenreaktionen von Zucker. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 569 (1900).

[5]) Siehe u. a. *B. Tollens*, Kurzes Handb. d. Kohlenhydrate. I. 2. Aufl. S. 91; II. S. 132. Über das Verhalten der Stärke bei der Hydrolyse mit ziemlich konzentrierter Schwefelsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **39**. S. 2190 (1906).

[6]) *Heinrich Rosin*, Beitrag zur wissenschaftl. Medizin d. Chemie. *Salkowski*-Festschrift. Berlin 1904. S. 105. Vgl. auch: Eine Verschärfung der *Seliwanoff*schen Reaktion. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38. S. 555 (1903); Über eine Reaktion im Harn bei Behandlung mit Resorzin. Ebenda. Bd. **41**. S. 549 (1904).

glaubt, daß durch das Erhitzen mit Säure und sogar mit Wasser allein Glukose in Fruktose übergeführt werde.

Dies ist in der Tat wahrscheinlich, denn *Ost*[1]) gelang es, durch Digerieren von Glukose mit kalter, ziemlich konzentrierter Schwefelsäure etwas reine Fruktose zu gewinnen!

Die Resorzinreaktion der Fruktose ist mehrfach bearbeitet worden, um sie einerseits empfindlicher und andrerseits sicherer zu machen. Hier sind die Namen *Rosin*[2]), *Ofner*, *R.* und *O. Adler*[3]), *Jolles*, *Neumann* und *L. Borchardt*[4]) zu nennen. Es scheint am sichersten zu sein, den HCl-Gehalt der zu prüfenden Flüssigkeit auf $12^1/_2$% (spezifisches Gewicht 1·06) zu normieren, also z. B. zur Harnprüfung auf Fruktose gleiche Volume Harn und 25%ige Salzsäure anzuwenden. Ist nach Zusatz von etwas Resorzin und dem Erwärmen die Rotfärbung aufgetreten, so schüttelt man die mit Soda gesättigte Flüssigkeit nach *Rosin* mit reinem Amylalkohol, welcher den roten Farbstoff löst und Spektral- und Fluoreszenzerscheinungen zeigt oder nach *Borchardt*, welcher *Rosins* Vorschrift verwirft, mit Essigäther, welcher sich, falls Fruktose vorhanden ist, gelb färbt. Nitrite und Indikan dürfen nicht gleichzeitig neben Fruktose vorhanden sein. *W. Voit*[5]) weist diese Reaktionen als nicht entscheidend zurück.

Malfatti[6]) rät, vor Anstellung der *Borchardt*schen Reaktion auf Fruktose im Harn, den Harn mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure und dann mit starker Kaliumpermanganatlösung so lange zu versetzen, bis die rote Farbe des Permanganats nur langsam verschwindet; eine durch geringen Überschuß bewirkte Braunfärbung verschwindet beim Erwärmen. Darauf stellt man die *Borchardt*sche Probe durch 1 Minute dauerndes Erwärmen mit Resorzin und soviel Salzsäure, daß die Flüssigkeit 12% HCl enthält, an.

Pinoff[7]) hat die Resorzinmethode genauer gestaltet, indem er zum Erhitzen der Fruktose mit Resorzin nicht Salzsäure, sondern ein Ge-

---

[1]) *H. Ost*, Umwandlung der Dextrose in Lävulose und Nachweis der Lävulose. Zeitschr. f. angew. Chem. Jg. **1905**. S. 1170.

[2]) *Heinrich Rosin*, Eine Verschärfung der *Selivanoff*schen Reaktion. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **38**. S. 555 (1903).

[3]) *Rudolf* und *Oskar Adler*, Über eine Reaktion im Harn bei der Behandlung mit Resorzin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 567 (1904).

[4]) *L. Borchardt*, Über die diabetische Lävulosurie und den qualitativen Nachweis der Lävulose im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **55**. S. 241 (1908), woselbst die Zitate der Arbeiten von *Ofner*, *Adler*, *Jolles*, *Neumann*. Vgl. auch: Über das Vorkommen von Lävulose im diabetischen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **58**. S. 122 (1908).

[5]) *Wilhelm Voit*, Über das Vorkommen von Lävulose in diabetischen Harnen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58. S. 122 (1908).

[6]) *Hans Malfatti*, Zur Beurteilung der *Selivanoff*schen Lävulosereaktion im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58. S. 544 (1909).

[7]) *E. Pinoff*, Über einige Farben- und Spektralreaktionen der wichtigsten Zuckerarten. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 38. S. 3314 (1905).

misch von 750 cm^3 Alkohol von 96° Tr. und 200 *g* konzentrierter Schwefelsäure verwandte.

Erhitzt man 0·05 *g* Fruktose, 5 cm^3 des Alkohol-Schwefelsäuregemisches, 5 cm^3 Alkohol und 0·2 cm^3 einer 5%igen Resorzinlösung, so tritt beim Einsetzen des Probierrohres in das heiße Wasserbad nach 1 Minute die Rotfärbung ein, ebenso bei Anwendung der Fruktose haltenden Zuckerarten, Rohrzucker und Raffinose, und auch mit Sorbose, mit anderen Glykosen tritt dagegen erst nach 35 Minuten Färbung ein.

Aus den obigen Diskussionen kann man, wie es auch *Pieraerts*[1]) tut, den Schluß ziehen, daß die Rotfärbung mit Resorzin und Salzsäure, wenn sie schnell und stark auftritt, die Gegenwart von Fruktose wenigstens höchst wahrscheinlich anzeigt, daß aber eine geringe, erst nach längerem Erwärmen auftretende Rotfärbung nicht beweisend ist.

Wendet man statt Resorzin auf gleiche Weise Naphtoresorzin an, so erhält man nach *Tollens* und *Rorive*[2]) eine etwas mehr violettrote, also noch schönere Färbung.

Nach *Fenton* und *Gostling*[3]) geben ätherische Bromwasserstofflösungen mit verschiedenen Kohlenhydraten, wie Xylose, Rohrzucker, Fruktose und auch Zellulose, indem hierbei Brom-Methyl-Furfurol entsteht, eine schöne Purpurrotfärbung.

Die Fruktose scheidet nach *Neuberg*[4]) mit Methylphenylhydrazin in schwach alkoholischer Lösung nach 5—10 Minuten langem Erwärmen auf dem Wasserbade ein hellgelbes, bei 158—160° schmelzendes, in Nadeln kristallisiertes Osazon, $C_{20}H_{26}N_4O_4$, welches rechts dreht, ab. Glukose und Mannose geben auf diese Weise kein Osazon.

Diese Reaktion hat *Neuberg*[5]) zur Auffindung von Fruktose in menschlichen Exsudaten benutzt.

Ofner[6]) widerspricht jedoch diesen Angaben und teilt mit, daß das Erscheinen des Methylphenylosazons zwar bei Fruktose relativ schnell eintritt, aber daß es keineswegs charakteristisch für Fruktose ist, indem es sich auch aus Glukoselösungen abscheidet. *Neuberg* widerspricht dieser Angabe.

---

[1]) *Pieraerts*, Sep.-Abdr. aus Bulletin de l'association des Chimistes de Sucrerie et de Distillerie de France et des Colonies. No. 7. Janvier 1907.

[2]) *B. Tollens* und *F. Rorive*, Über Farben- und Spektralreaktionen der Zuckerarten mit Naphtoresorzin und Salzsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **41**. S. 1785 (1908).

[3]) *Henry J. Horstman Fenton* und *Mildbred Gostling*, Brommethylfurfuraldehyd; The action of Hydrogen Bromide on Carbohydrates. Journ. chem. soc. **1899**. S. 423; **1901**. 361; zitiert nach *C. Neuberg* und *H. Strauß*, Über Vorkommen und Nachweis von Fruchtzucker in den menschlichen Körpersäften. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 228 (1902) und *v. Lippmann*, Zuckerarten. S. 837.

[4]) *Carl Neuberg*, Über die Isolierung von Ketosen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 959 (1902).

[5]) Siehe 2.

[6]) *Rudolf Ofner*, Über den Nachweis von Fruchtzucker in menschlichen Körpersäften. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 359 (1905).

Ferner kann man Fruktose, auch im Gemenge mit anderen Glykosen, daran erkennen, daß sie kräftigere und schnellere Reduktionskraft zeigt als jene.

Pinoff[1]) empfiehlt zu diesem Zwecke eine Lösung von molybdänsaurem Ammonium. 0·1 *g* Fruktose, 10 *cm*³ einer 4⁰/₀igen Lösung von Ammoniummolybdat, 10 *cm*³ Wasser, 0·2 *cm*³ Eisessig liefern beim Erhitzen in Probiergläsern im Wasserbade bei 95—98⁰ eine schöne Blaufärbung, während die Lösungen der anderen Zuckerarten vollkommen farblos bleiben. Etwa vorhandene Mineralsäuren müssen vor dem Versuche neutralisiert werden, weil bei deren Gegenwart auch andere Glykosen Blaufärbung hervorbringen.

Pieraerts[2]) wendet Lösungen von von *E. Merck* bezogenem Kupferhydroxyd in einer Lösung von Mono- und Di-Kaliumkarbonat oder in alkalischen Lösungen von Amidoessigsäure an.

Diese Lösungen werden von anderen Glykosen in der Kälte nicht verändert, von Fruktose dagegen im Laufe von 12 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur und von einer Stunde bei 30⁰. *Pieraerts* rät, 20 bis 25 *g* der zu prüfenden Substanz in 150—200 *cm*³ kaltem Wasser zu lösen, mit Bleiessig zu versetzen, das Filtrat mit Natriumsulfat von Blei zu befreien und so zu verdünnen, daß 5⁰/₀ Zucker in der Lösung vorhanden sind. Die Amidoessigsäurelösung wird wie folgt bereitet: Zu einer im Wasserbade erhitzten wässerigen Lösung von 12 *g* Glykokoll setzt man allmählich 6 *g* Kupferhydroxyd, welche sich auflösen, dann kühlt man auf 60⁰ C ab, fügt 50 *g* Di-Kaliumkarbonat (carbonate neutre de potasse) hinzu und füllt zu 1 *l* auf.

δ) Reaktionen der Galaktose.

Schleimsäurereaktion.

Schon lange ist bekannt, daß aus Milchzucker sowie verschiedenen pflanzlichen Gummi- und Schleimarten beim Oxydieren mit Salpetersäure Schleimsäure entsteht, und andrerseits ist bekannt, daß aus den genannten Stoffen hydrolytisch Galaktose zu gewinnen ist (siehe unter anderen *Muntz*[3]).

In der Tat entsteht die Schleimsäure aus der Galaktosegruppe des Milchzuckers und der Gummiarten, und ihre Entstehung zeigt die Gegenwart von Galaktosengruppen in der untersuchten Substanz an. Die Oxydation kann mit Salpetersäure von 1·15 spezifischem Gewicht in Schalen vorgenommen werden, und zwar genau wie bei der Prüfung auf Glukosegruppen (siehe oben S. 105), indem man 5 *g* der betreffenden Substanzen mit 30 *cm*³ Salpetersäure von 1·15 spszifischem Gewicht unter

[1]) *E. Pinoff,* Über einige Farben- und Spektralreaktionen der wichtigsten Zuckerarten. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 38. S. 3317 (1905).

[2]) *J. Pieraerts,* Belgische Annales de Pharmacie. März-April 1908.

[3]) *A. Muntz,* Sur l'existence des éléments du sucre de lait dans les plantes. Ann. Chim. Phys. [6]. T. **10**. p. 566 (1887).

Umrühren in Schalen zu einer dicken Masse eindampft, dann diese mit wenig Wasser zerrührt, und am folgenden Tage die Schleimsäure absaugt, wäscht, trocknet und auf den Schmelzpunkt (ca. 213°) prüft.

Noch besser, und sogar zur quantitativen Bestimmung der Galaktose zu benutzen, ist die Methode der Anwendung des Doppelten der obigen Menge Salpetersäure und des Abdampfens auf $^1/_3$ des Volums, wie sie *Tollens* mit *Kent*[1]), *Creydt*[2]) und *Rischbieth*[3]) angewandt hat.

5 *g* der zu prüfenden Substanzen werden in Bechergläsern von zirka 5 *cm* Durchmesser und 7—8 *cm* Höhe mit 60 *cm*³ Salpetersäure von 1·15 spezifischem Gewicht übergossen und im kochenden Wasserbade unter Umrühren erhitzt, bis die anfänglich ca. 2·5 *cm* betragende Höhe der Flüssigkeit auf möglichst genau $^1/_3$, also auf 8—9 *mm* heruntergedampft ist.

Man setzt dann beiseite, zerrührt am folgenden Tage mit 10 *cm*³ Wasser, saugt die Schleimsäure ab, trocknet, wägt und untersucht sie.

Wendet man nicht reine Kohlenhydrate, sondern Stoffe der Natur, welche Zellulose, Kalksalze usw. enthalten, an, so kann die etwa entstandene Schleimsäure mit anderen Stoffen gemengt sein. Man gewinnt sie rein, indem man den erhaltenen Absatz mit Wasser und Natrium- oder Ammoniumkarbonat kocht[4]), die Flüssigkeit vom Ungelösten absaugt, sie in einer Platinschale bis fast zur Trockne eindunstet und den erhaltenen Rückstand mit etwas verdünnter Salpetersäure zerrührt, worauf die Schleimsäure abfiltriert, getrocknet und auf den Schmelzpunkt ca. 213° geprüft wird.

ε) Anhang: Reaktion des Inosit, $C_6H_{12}O_6$.

Der Inosit wird in kristallisiertem Zustande oder auch in Sirupform durch die rötliche Farbe nachgewiesen, welche er beim Abdampfen mit Salpetersäure und Chlorcalcium infolge der Bildung von rhodizonsaurem Calcium zeigt. *Scherer*[5]) empfahl das Abdampfen mit einigen Tropfen Salpetersäure zur Trockne, Zusetzen eines Tropfens ammoniakalischer Chlorcalciumlösung und neues Abdampfen, wobei ein rosenroter Rückstand bleibt. *Seidel*[6]) setzt statt des Chlorcalciums essigsaures Strontium

[1]) *W. H. Kent* und *B. Tollens,* Untersuchungen über Milchzucker und Galaktose. Ann. Chem. Vol. **227**. p. 221 (1885).

[2]) *R. Creydt* und *B. Tollens,* Versuch, die Raffinose in Gemengen quantitativ zu bestimmen. Ann. Chem. Vol. **232**. p. 205 (1885).

[3]) *L. Rischbieth* und *B. Tollens,* Versuche mit Melasse- und Baumwollraffinose Ann. Chem. Vol. **232**. p. 186 (1885).

[4]) *J. B. Lindsey* und *B. Tollens*, Über Holzsulfitflüssigkeit und Lignin. Ann. Chem. Vol. **267**. p. 348 (1892).

[5]) *J. Scherer,* Über den Inosit. Ann. Chem. Pharm. Bd. **81**. S. 375 (1852); Bd. **73**. S. 322 (1850).

[6]) *Seidel,* s. in *Koberts* Untersuchungen über die Darstellung und Eigenschaften des Inosits sowie dessen Verbreitung im Pflanzenreich. Chemikerzeitung. Jg. **1887**. S. 676.

oder essigsaures Aluminium und Ammoniak zu, und *Gallois*[1]) dampft Inosit mit salpetersaurem Quecksilber ab, wobei ein gelber, bei stärkerem Erhitzen rot werdender Rückstand bleibt. *Denigès*[2]) erhält nach dem Abdampfen des Inosits mit Salpetersäure beim Erwärmen mit essigsaurem Quecksilberoxyd und mit essigsaurem Baryum gelbe, rötliche, bläuliche Farben.

Mir ist die Reaktion auf die Weise, welche *Salkowski* und *P. Mayer*[3]) empfehlen, am besten gelungen: „Die Substanz wird mit einigen Tropfen Chlorcalciumlösung zur Trockne gedampft, der Rückstand mit Salpetersäure befeuchtet und wieder verdampft: rosenrote Färbung."

6. Einzelreaktionen der Di- und Polysaccharide.

Um Naturprodukte auf Di- und Polysaccharide zu prüfen, bedient man sich vielfach der im vorigen Abschnitt betrachteten Reaktionen auf die in den zusammengesetzten Sacchariden befindlichen Glykosen, z. B. benutzt man bei der Reaktion auf Rohrzucker die Reaktion auf Glukose und auf Fruktose, oder bei der Reaktion auf Milchzucker und auf Raffinose u. a. die Reaktion auf Galaktose.

Ferner aber benutzt man einige Spezialreaktionen, welche einerseits diejenigen sind, welche bei den Darstellungen in Anwendung kommen, z. B. die Strontian-Fällungsmethode beim Rohrzucker, oder man benutzt die Polarisation der betreffenden Zuckerarten, und zwar sowohl in unverändertem Zustande als auch nach der Hydrolyse durch Erhitzen mit verdünnter Mineralsäure oder durch Enzymtätigkeit.

α) Reaktionen des Rohrzuckers.

Da der Rohrzucker eine Verbindung aus Glukose und Fruktose ist, da er *Fehling*sche Lösung nicht reduziert, da er eine erhebliche Rechtspolarisation besitzt, und da andrerseits das bei der Hydrolyse entstehende Gemenge von Glukose und Fruktose (d. h. der Invertzucker) stark reduziert und die Ebene des polarisierten Lichtes nach links dreht, so ergeben sich folgende Reaktionen:

Man reagiert auf Fruktose mit Resorzin und Salzsäure oder (nach der Hydrolyse) mit Methylphenylhydrazin (siehe Fruktose).

Auf Glukose reagiert man durch Abdampfen mit Salpetersäure und Nachweisung der Zuckersäure (siehe Glukose).

Man prüft die Reduktionsfähigkeit der betreffenden Flüssigkeit direkt und nach dem Erwärmen mit einigen Tropfen Salzsäure, Abkühlen und Neutralisation mit etwas Soda, oder man bringt in die auf Rohr-

[1]) *Gallois*, Über die Auffindung des Inosits im Harn. Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. 4. S. 264 (1865); das. nach „De l'inosurie". Paris 1864 und *Schmidts* Jahrbücher d. ges. Medizin. Jg. 1865. S. 148.

[2]) *G. Denigès*, Nouvelles réactions de l'inosite. Bull. de la Soc. chim. de France [4]. T. 1. p. 751.

[3]) *P. Mayer*, Über das physiologische Verhalten von Inosit. Biochemische Zeitschrift. Bd. 2. S. 398 (1907).

zucker zu prüfende, vorher zu sterilisierende Flüssigkeit nebst einem Tropfen Toluol etwas Invertin (Invertase), digeriert einige Zeit und prüft wieder. Die Wirkung des reinen Invertins tritt sehr schnell ein; so ist sie z. B. nach *Wroblewski*[1]) nach 3 Minuten schon sehr erheblich.

Wenngleich das Eintreten dieser Reaktionen schon die Gegenwart von Rohrzucker sehr wahrscheinlich macht, so ist doch die Möglichkeit der Verwechslung, z. B. mit Stachyose, welche ähnliche allgemeine Reaktionen zeigt, vorhanden, und es ist am sichersten, den Rohrzucker in kristallisierter Form abzuscheiden und dann seine Eigenschaften, und hier besonders seine Polarisation vor und nach der Hydrolyse, festzustellen.

Zu diesem Zweck befolgt man die bei den Darstellungsmethoden angegebenen Vorschriften und speziell die Strontianfällungsmethode von *E. Schulze,* welche früher bei den Darstellungsmethoden erläutert worden ist (S. 79/80).

β) Reaktionen der Maltose.

Direkte Reaktionen zur Entdeckung von Maltose sind kaum bekannt, da die Maltose sich gegenüber den meisten Reagenzien fast genau wie Glukose verhält, und dies ist natürlich, da sie bei der Hydrolyse zu 2 Mol. Glukose zerfällt:

$$\underset{\text{Maltose}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + H_2O = \underset{\text{Glukose.}}{2\,C_6H_{12}O_6}$$

Nur soll Maltose ebenso wie Milchzucker nach *Wöhlk* beim Erwärmen mit Ammoniak eine krapprote Färbung geben (s. Milchzucker).

Maltose dreht viel stärker rechts als die Glukose [(α)D = 137—138° gegen 52·7°, siehe quantitative Bestimmungen] und andrerseits reduziert sie *Fehling*sche Lösung schwächer als Glukose; man kann folglich, wenn man beide Bestimmungen ausführt, auf die Gegenwart von Maltose schließen, falls obiges der Fall ist und falls ähnliche Stoffe nicht vorhanden sind.

Wenn man Maltoselösungen mit Salzsäure erhitzt (200 cm^3 der Lösung mit 15 cm^3 Salzsäure von 1·125 spez. Gew. oder 25% HCl), wird die Maltose hydrolysiert, wobei die Drehung sinkt und das Reduktionsvermögen gegen *Fehling*sche Lösung steigt. Zugleich tritt gegen die *Barfoed*sche Lösung von Kupferacetat Reduktionsvermögen auf.

Mit Phenylhydrazin bildet sich nach *E. Fischer*[2]) auf die gewöhnliche Weise bei 1½stündigem Erhitzen das Maltosephenylosazon oder Maltosazon, $C_{12}H_{20}O_9(N_2H.C_6H_5)_2$ oder $C_{24}H_{32}N_4O_9$, welches jedoch nicht während des Erhitzens, sondern erst beim Erkalten ausfällt, in deutlichen isolierten Nadeln kristallisiert und bei raschem Erhitzen bei 206° schmilzt. Es ist im äußeren dem Phenylglykosazon sehr ähnlich, unterscheidet sich aber von diesem durch seine differierende Zusammensetzung

---

[1]) *A. Wroblewski*, Über die chemische Beschaffenheit der amylolytischen Fermente. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **31**. S. 1130, 1135 (1898).

[2]) *E. Fischer*, Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten I und II. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **17**. S. 583 (1884); Jg. **20**. S. 831 (1887).

und durch leichtere Löslichkeit in heißem Wasser. Ferner zeigt es auch nach *Grimbert* [1]) leichtere Löslichkeit in Aceton, so daß man aus dem betreffenden Osazongemenge durch Auskochen mit wenig Wasser und durch Extrahieren des beim Erkalten des Auszuges auskristallisierten, schon reineren Maltosephenylosazons mit 50%igem Aceton das Maltosazon rein erhalten kann.

γ) Reaktionen des Milchzuckers (Laktose, Laktobiose).

Der Milchzucker reduziert *Fehling*sche Lösung.

Der Milchzucker zerfällt bei der Hydrolyse zu Glukose und Galaktose:

$$\underset{\text{Milchzucker}}{C_{12}H_{22}O_{11}\,.\,H_2O} = \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Galaktose}}{C_6H_{12}O_6}$$

folglich erhält man beim Abdampfen von Milchzuckerlösungen mit Salpetersäure sowohl die Zuckersäurereaktion nach *Gans* und *Tollens* [2]), als auch Schleimsäure (s. auch unten).

Die relative Schwerlöslichkeit und die, wenn auch nicht ganz schnell, aber doch leicht vor sich gehende Kristallisation des Milchzuckers erleichtert die Auffindung desselben; man verfährt, wie bei der Darstellungsmethode angegeben ist, und prüft die erhaltenen Kristalle auf ihre Polarisation, auf Schleimsäurebildung usw.

Handelt es sich um die schnelle Unterscheidung von Milchzucker und Rohrzucker, so prüft man zuerst, ob die Substanz *Fehling*sche Lösung reduziert, da Milchzucker Reduktion zeigt, Rohrzucker aber nicht. Dann benutzt man mit Vorteil die Eigenschaft der Fruktose des Rohrzuckers, sich mit Resorzin und Salzsäure zu röten und mit konzentrierter Schwefelsäure zu schwärzen.

Man löst zu diesem Zwecke etwas des fraglichen Zuckers in Wasser. Man vermischt dann einen Teil dieser Lösung mit $^1/_3$—$^1/_4$ des Volums an konzentrierter Salzsäure und etwas Resorzin und erhitzt, wobei Rohrzucker die Fruktoserötung gibt, Milchzucker dagegen nicht. Einen anderen Teil der Lösung gießt man sehr vorsichtig auf in einem Probierglase befindliche konzentrierte Schwefelsäure, wobei die Milchzuckerlösung keine Färbung zeigt, die Rohrzuckerlösung dagegen nach kurzer Zeit eine dunkle Berührungsschicht entstehen läßt.[3])

Auch die Schwerlöslichkeit des Milchzuckers in 65%igem Weingeist (10 *cm*³ lösen nur 0·03 *g* Milchzucker) bildet ein Unterscheidungsmerkmal.

Mit $1^1/_2$ Teilen Phenylhydrazin-Hydrochlorat, 2 Teilen Natriumacetat und 30 Teilen Wasser liefert der Milchzucker bei $1^1/_2$stündigem

---

[1]) *Grimbert*, Recherche de petites quantités de maltose en présence du glucose. Journal de Pharmacie [6]. T. **17**. p. 225.

[2]) *R. Gans* und *B. Tollens*, Über die Bildung von Zuckersäure als Reaktion auf Dextrose. Raffinose enthält Dextrose. Ann. Chem. Vol. **249**. p. 222 (1888).

[3]) *John Landin*, Nachweis von Rohrzucker im Milchzucker. Chemiker-Zeitg. Bd. **24**. S. 211 (1900); Rohrzucker im Milchzucker. Chemiker-Zeitg. Bd. **24**. S. 272 (1900).

Erhitzen im Wasserbade nach *E. Fischer*[1]), nicht während des Erhitzens sondern beim Erkalten. Nädelchen des Laktosephenylosazons, $C_{24}H_{32}N_4O_9$, welches bei 200° schmilzt (siehe auch *Maquenne*[2]); es bildet nach *de Graaff*[3]) mikroskopische kugelförmige Aggregate feiner Nadeln.

Mit Bleiessig und Ammoniak liefert der Milchzucker nach *Rubner*[4]) eine rote Färbung. Man soll den Milchzuckerlösungen etwas neutrales Bleiacetat zusetzen, 3—4 Minuten kochen, dann Ammoniak zusetzen, bis eben ein bleibender Niederschlag entsteht, worauf die Flüssigkeit gelb und dann rot wird und sich allmählich ein roter Niederschlag bildet (*Vulpius*[5]).

Bei 10 Minuten langem Erwärmen mit 10%igem Ammoniak gibt nach *Wöhlk*[6]) Milchzucker eine krapprote Färbung.

Die Schleimsäurereaktion benutzt *Bauer*[7]) zum Nachweis des Milchzuckers im Harn, indem er 100 *cm*³ Harn je nach der Konzentration mit 20 bis gegen 35 *cm*³ Salpetersäure von 1·4 spez. Gew. in einem breiten Becherglase im siedenden Wasserbade erhitzt, bis die Flüssigkeit bis auf das Volum der zugesetzten Salpetersäure eingedunstet ist.

Die Schleimsäure scheidet sich als Pulver ab und wird nach dem Erkalten und Verdünnen abfiltriert, gewaschen, gewogen und auf den Schmelzpunkt (213—215° C) geprüft.

δ) Reaktionen der Raffinose, $C_{18}H_{32}O_{16} + 5\,HO_2$

Wie der Rohrzucker reduziert die Raffinose *Fehling*sche Lösung nicht.

Da die Raffinose aus Glukose, Fruktose und Galaktose besteht und bei starker Hydrolyse in diese zerfällt:

$$\underset{\text{Raffinose}}{C_{18}H_{32}O_{16}} + 2\,H_2O = \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{16}O_6} + \underset{\text{Fruktose}}{C_6H_{12}'O_6} + \underset{\text{Galaktose,}}{C_6H_{12}O_6}$$

gibt sie die Reaktionen dieser 3 Hexosen und folglich die Resorcin-Salzsäurefärbung der Fruktose, die Zuckersäurereaktion der Glukose und die Schleimsäurereaktion der Galaktose.

Für die Raffinose charakteristisch ist ihr hohes Rechtsdrehungsvermögen, $(\alpha)D = +104—105°$, welches bei dem Verfahren, welches zur Hydrolyse oder Inversion des Rohrzuckers benutzt wird (Erwärmen mit 75 *cm*³ Wasser und 5 *cm*³ konzentrierter Salzsäure auf 69° C), auf zirka

---

[1]) *E. Fischer*, Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten I und II. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **17**. S. 582 (1884); Jg. **20**. S. 828 (1887).

[2]) *M. Maquenne*, Sur l'emploi de la phénylhydrazine à la détermination des sucres. Compt. rend. T. **112**. p. 799 (1891).

[3]) *W. C. de Graaff*, Laktosazonbildung. Chem. Zentralbl. Jg. **1905**. I. S. 1573.

[4]) *Max Rubner*, Über die Einwirkung von Bleiacetat auf Trauben- und Milchzucker. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **18**. Ref. S. 480 (1885); daselbst nach Zeitschr. f. Biologie. Bd. **20**. S. 387 (1885).

[5]) *G. Vulpius*, Zur Milchzuckerprüfung. Archiv d. Pharm. (3). Bd. **24**. S. 299.

[6]) *Afred Wöhlk*, Über eine neue Reaktion auf Milchzucker (und Maltose). Zeitschrift f. anal. Chem. Bd. **43**. S. 670 (1904).

[7]) *R. Bauer*, Eine expeditive Methode zum Nachweis von Galaktose und Milchzucker im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **51**. S. 158 (1906/07).

die Hälfte heruntergeht (nach den von *Herzfeld*[1]) aus seinen Versuchen und den von *Tollens* und verschiedenen Mitarbeitern angestellten Versuchen von 157·15° auf 80·53° oder von 100° auf 51·24°).

Zur Erkennung und sogar zur quantitativen Bestimmung der Raffinose empfiehlt *Bau*[2]), die Benutzung der Eigenschaft der Raffinose mit Unterhefe der Brauereien vollständig zu vergären, mit Oberhefe dagegen sich nur unvollständig zu spalten, indem neben dem nicht vergärenden Disaccharide, der Melibiose, freie Fruktose entsteht:

$$\underset{\text{Raffinose}}{C_{18}H_{32}O_{16}} + H_2O = \underset{\text{Melibiose}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{\text{Fruktose}}{C_6H_{12}O_6}.$$

Die Fruktose vergärt dann. Man erhält also mit Unterhefe dreimal so viel Alkohol und Kohlensäure als mit Oberhefe, denn die drei dann frei gewordenen Glykosen sind gärfähig.

Nach *Neuberg*[3]) kann man Raffinose selbst bei Gegenwart von sehr viel Rohrzucker nachweisen, indem man die von *Neuberg* gefundene Angreifbarkeit derselben durch das Enzym der süßen Mandeln, das Emulsin, benutzt, welches Raffinose spaltet, aber Rohrzucker nicht angreift.

Hierbei wird die Raffinose in Rohrzucker und Galaktose gespalten:

$$\underset{\text{Raffinose}}{C_{18}H_{32}O_{16}} + H_2O = \underset{\text{Rohrzucker}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{\text{Galaktose.}}{C_6H_{12}O_6}$$

Da die Galaktose *Fehling*sche Lösung reduziert, tritt beim Erhitzen der mit Emulsin digerierten Flüssigkeit mit *Fehling*scher Lösung starke Kupferoxydulabscheidung ein.

Man digeriert z. B. 10 *g* Raffinose (oder des Raffinose enthaltenden Rohrzuckers), gelöst in 100 *cm*³ Wasser mit 3 *g* Emulsin (von dessen Brauchbarkeit man sich vorher überzeugt hat), und einigen Tropfen Toluol bei 38° C im Brutschrank, und man bemerkt nach 24 Stunden erhebliche Reduktionskraft und Abnahme der spezifischen Drehung, da sowohl Rohrzucker als auch Galaktose weniger stark als Raffinose drehen.

Rohrzucker wird von reinem Emulsin nicht angegriffen.

---

[1]) *Alexander Herzfeld,* Die Bestimmung des Zuckergehaltes der Handelsware. Zeitschr. d. Ver. d. deutschen Zuckerindustrie. Bd. **40**. S. 197 (1890).

[2]) *A. Bau,* Melitriose und deren quantitative Bestimmung. Chem.-Ztg. Bd. **18**. S. 1794 (1894); Bd. 21. S. 188 (1897).

[3]) *C. Neuberg,* Zur Kenntnis der Raffinose. Abbau der Raffinose zu Rohrzucker und d-Galaktose. Biochem. Zeitschr. Bd. **3**. S. 519 (1907). — *Neuberg* und *Marx,* Über den Nachweis kleiner Mengen von Raffinose. Biochem. Zeitschr. Bd. **3**. S. 535 (1907).

C. Die wichtigsten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Zuckerarten.

Von **B. Tollens**, Göttingen.

a) Allgemeines.

Die quantitative Bestimmung der in pflanzlichen und in tierischen Stoffen vorhandenen Zuckerarten geschieht in den meisten Fällen erstens mittelst alkalischer Metallösungen (und besonders mittelst alkalischer Kupferlösungen) und zweitens durch die Feststellung der drehenden Einwirkung auf die Ebene des polarisierten Lichtes mittelst der verschiedenen Polarisationsapparate, und nur in einigen Fällen, wie z. B. bei den Pentosen, der Glukuronsäure, der Mannose und der Galaktose, auf andere Weise.

Die Bestimmung durch alkalische Metalllösungen ist in einem anderen Teile dieses Buches beschrieben, die Bestimmung durch Polarisation möge dagegen hier zuerst im allgemeinen und dann in Hinsicht der speziellen Anwendungen besprochen werden.

b) Bestimmung durch Polarisation.

Wie *Biot* zuerst zeigte, sind die Zuckerarten mit drehender Kraft auf die Schwingungsebene des polarisierten Lichtes begabt, und diese Drehung findet bald nach rechts, bald nach links statt, d. h. es wird der obere Teil der senkrecht stehend gedachten Polarisationsebene durch das Licht, welches die Zuckerlösung passiert — vom Standpunkte des Beobachters aus gerechnet —, bei Rechtsdrehung im Sinne der Bewegung des Zeigers der Uhr gedreht, und bei Linksdrehung im entgegengesetzten Sinne. Rechtsdrehung wird mit +, Linksdrehung mit — bezeichnet.

Diese Drehungen sind etwas verschieden, je nachdem im Licht von verschiedener Farbe und Wellenlänge beobachtet wird, und man bedient sich jetzt fast allgemein des hellen gelben Lichtes, und zwar des Lichtes von der Wellenlänge der *Fraunhofer*schen Linie D, d. h. des Lichtes einer durch Chlornatrium gelb gefärbten Flamme, welches zum Zwecke der Erreichung möglichster Homogenität noch eine am Apparate befindliche Lösung von rotem Dikaliumpyrochromat passiert.

c) Begriff und Ermittlung der spezifischen Drehung.

Um die Drehungen der einzelnen Zuckerarten ihrer Stärke nach einheitlich zu definieren und sie vergleichen zu können, hat *Biot* den Begriff der spezifischen Drehung eingeführt; diese spezifische Drehung oder (α) ist der Winkel, um welchen die Polarisationsebene durch eine wasserfrei gedachte Schicht des Zuckers von 100 *mm* Länge und vom spezifischen Gewicht des Wassers oder 1 gedreht wird.

Wenn die Beobachtung mit Licht von der Wellenlänge D (also mit Natriumlicht) ausgeführt wird, setzt man zu (α) noch D hinzu.

Man berechnet die spezifische Drehung oder (α) D aus der Drehung einer Zuckerlösung von bekanntem Gehalt und von bekanntem spezifischen Gewicht mittelst der Formel:

$$(\alpha)\,D = \frac{\alpha \,.\, P}{p \,.\, l \,.\, d}$$

worin α die beobachtete Drehung, P das Gewicht der Lösung, welche p Gramm Zucker enthält, d das spezifische Gewicht der Lösung und l die Länge in *dm* der Schicht Zuckerlösung, welche beobachtet wird, bedeuten.

Z. B. ist bei Rohrzuckerlösung von 10% Gehalt, welche im 200 *mm*-Rohr des Polarisationsapparates beobachtet wird, das spezifische Gewicht 1·040 besitzt und 13·83° Winkeldrehung ergibt, die spezifische Drehung = = 66·5°, denn

$$(\alpha)\,D = \frac{13{\cdot}83 \,.\, 100}{10 \,.\, 2 \,.\, 1{\cdot}040} = +\,66{\cdot}5^0.$$

Wenn von der Zuckerlösung bekannt ist, wieviel Gramm Zucker sie in 100 *cm*³ (nicht in 100 *g*) enthält, fällt das spezifische Gewicht aus der Berechnung fort, und es ergibt sich die einfachere Formel:

$$(\alpha)\,D = \frac{\alpha \,.\, V}{c \,.\, l}$$

worin α die beobachtete Drehung, V das Volumen (oder 100 *cm*³) und c die in dem Volum enthaltenen Gramm Zucker bedeuten: z. B. bei einer Lösung von 10 *g* Zucker in 100 *cm*³ der Lösung, welche 13·3° dreht,

$$(\alpha)\,D = \frac{13{\cdot}3^0 \,.\, 100}{10 \,.\, 2} = +\,66{\cdot}5^0.$$

Mit Hilfe dieser Formeln kann man leicht alle in Betracht kommenden Berechnungen ausführen, und hier kommt besonders diejenige in Betracht, welche man anwendet, wenn man die Drehung einer Lösung bestimmt hat, deren Zuckerart bekannt ist, und deren Gehalt man wissen will. Findet man z. B. für eine Rohrzuckerlösung im 200 *mm*-Rohr eine Drehung von 13·3° nach rechts, so wandelt man die Formel: $(\alpha)\,D = \frac{\alpha \,.\, V}{c \,.\, l}$ um in $c = \frac{\alpha \,.\, V}{(\alpha)\,D \,.\, l}$ oder in diesem Falle in $c = \frac{13{\cdot}3 \,.\, 100}{66{\cdot}5 \,.\, 2} = 10$ und erhält 10 *g*

Rohrzucker in 100 cm^3. Will man nicht diese (häufig, aber ungenau „Volumprozente" genannte) Zahl, sondern wirkliche Prozente haben, so dividiert man noch durch das spezifische Gewicht der Lösung.

Die spezifischen Drehungen der Zuckerarten sind sehr verschieden, und zwar bald nach rechts, bald nach links, und zwar sind von denselben Zuckerarten stets je 2 Modifikationen vorhanden, welche gleiche Zahlen für die spezifische Drehung zeigen, aber eine Modifikation dreht nach rechts, die andere dreht nach links, was mit der inneren Struktur der betreffenden Moleküle zusammenhängt und besonders von *E. Fischer* mit Anwendung der umfassenden Theorien von *van't Hoff* und *Lebel* erforscht ist. Diese beiden Modifikationen der Glukosen sind in der Lage ihrer Atome in der Art verschieden, daß die atomistischen Konfigurationen derselben sich zueinander wie das Spiegelbild eines Gegenstandes zu dem Gegenstande selbst verhält; sie sind „optisch entgegengesetzt", „optische Antipoden", oder sie sind „Antiloga" derselben Substanz.

Diese antilogen Zuckerarten werden mit d und l bezeichnet; zuweilen verbinden sich diese Modifikationen miteinander und bilden dann die „razemische", optisch inaktive Modifikation, welche mit r bezeichnet wird; so entsteht aus d- und l-Arabinose die r-Arabinose.

Außerdem existiert aber zuweilen noch eine Form, welche optisch inaktiv ist, weil die innere Struktur des Moleküls eine Drehung nicht veranlaßt. Diese Modifikation wird mit i bezeichnet. Vom Inosit sind diese 4 Modifikationen bekannt. Es sind somit bei den Zuckerarten dieselben Verhältnisse vorhanden wie z. B. bei der Weinsäure, von welcher man die d-Weinsäure, l-Weinsäure, dl- oder r-Weinsäure (Traubensäure) und die i-Weinsäure (Mesoweinsäure) kennt.

Über diese Gegenstände sowie über andere Feinheiten der Drehungserscheinungen, so über die mit der Konzentration der Zuckerlösungen etwas sich verändernden spezifischen Drehungen, sehe man die betreffenden Abhandlungen [1]) und besonders *Landolts* [2]) Buch nach.

Kurz möge noch angeführt werden, daß viele Zuckerarten gleich nach der Auflösung in Wasser einen andere Drehung zeigen als einige Stunden oder einen Tag nachher, worauf die Drehung konstant bleibt. Diese Erscheinung wird als „Birotation", richtiger wohl als „Multirotation", „Mutarotation" oder „Mehr- oder Wenigerdrehung" bezeichnet. Es ist bei einigen, z. B. bei der Glukose, Arabinose, Xylose, die Drehung am Anfange höher, bei anderen, wie bei der Maltose, die Drehung am Anfange niedriger als 12—24 Stunden später.

Über die Ursachen der Mutarotation und über die näheren hierbei auftretenden Erscheinungen, sowie über die angenommene Existenz ver-

[1]) Z. B. *E. Fischer*, Synthesen in der Zuckergruppe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. S. 2114 (1890).

[2]) *Landolt*, Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen und dessen praktische Anwendungen. Braunschweig 1898. 2. Aufl.

schiedener ineinander übergehender Modifikationen der betreffenden Zuckerarten sehe man näheres in den Lehr- und Handbüchern nach, sowie auch in den Abhandlungen, z. B. von *Tanret*[1]) und von *Jul. Meyer*[2]).

Diese Erscheinung ist zur Erkennung und Charakterisierung der Zuckerarten von Wert, aber zur quantitativen Bestimmung der Zuckerarten unbrauchbar; man beseitigt sie durch längeres Stehenlassen oder durch Aufkochen der frisch bereiteten Lösungen, oder man setzt nach *C. Schulze* und *Tollens*[3]) den Lösungen einige Tropfen Ammoniak hinzu, wodurch sofort die konstante Drehung hervorgebracht wird.

d) Ungefähre Zahlen für (α)D der häufigeren Zuckerarten.

Die ungefähren Zahlen der meistens benutzten konstanten Drehungen einiger häufiger vorkommender Zuckerarten mögen hier angegeben werden. sie entsprechen den ca. 10%igen Zuckerlösungen bei mittleren Temperaturen (gegen 20° C). Die genauen Zahlen finden sich bei den einzelnen Zuckerarten.

Gruppe		Zuckerart	(α)D
Pentosen $C_5H_{10}O_5$		l-Arabinose	+ 104°
		(d-Arabinose	− 104°)
		r-Arabinose	inaktiv
		l-Xylose	+ 19°
		(d-Xylose	— 19°)
		r-Xylose	inaktiv
Methyl-Pentosen $C_6H_{12}O_5$		Rhamnose, $C_6H_{12}O_5 + H_2O$	+ 8°
		Fukose	— 75°
		Rhodeose	+ 75°
Hexosen $C_6H_{12}O_6$	Aldosen	d-Glukose, Dextrose, Traubenzucker	+ 52·5°
		l-Glukose	— 52·5°
		d-Mannose	+ 14°
		d-Galaktose	+ 81°
	Ketosen	d-Fruktose, Lävulose, Fruchtzucker	— 92°
		Sorbose	— 42·5°
		Rohrzucker, Saccharose	+ 66·5°
		Maltose	+ 137—138°
		Milchzucker	+ 53°
		Raffinose	+ 104°
		Trehalose (Anhydrid)	+ 197°
		Anhang: Glukuronsäure	+ 19°

[1]) *M. C. Tanret*, Sur les modifications moléculaires et la multirotation des sucres. Bull. Soc. chim. [3]. T. **15**. p. 195 (1896).

[2]) *Jul. Meyer*, Zur Theorie der Rohzuckerinversion. Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. **62**. S. 59, 75 (1908).

[3]) *C. Schulze* und *B. Tollens*, Über die Xylose und ihre Drehungserscheinungen. Ann. Chem. Vol. **271**. p. 49 (1892).

Um die spezifische Drehung der rein und wenn möglich in Kristallen erhaltenen Substanzen zu bestimmen, verfährt man am besten folgendermaßen:

Man trocknet die Kristalle entweder längere Zeit über Schwefelsäure oder in einem zuerst kalten, dann wärmeren Wassertrockenschrank, den man sehr langsam erwärmt und im Laufe einiger Stunden bis zur Temperatur von 70° C bringt, worauf man die Substanz im Exsikkator erkalten läßt. Sie darf nicht gesintert oder geschmolzen sein, weil dann die Resultate wegen unregelmäßigen Wasserverlustes ungenau sein können, und weil dann die Mehr- oder Wenigerdrehung, deren Beobachtung für die Charakterisierung der Zuckerarten wichtig ist, teilweise oder ganz verschwunden ist.

Dann tariert man ein 20 *cm*³ fassendes Kölbchen mit Marke am 3 bis 4 *mm* weiten Halse und mit Glasstöpsel, wägt möglichst 2 *g* des Zuckers ein, bringt Wasser dazu, notiert die Zeit, löst unter Schütteln, bringt etwas Aluminiumhydroxyd dazu, füllt bis zur Marke auf, filtriert die gut gemischte Flüssigkeit, legt sie im 200 *mm*-Rohr sofort in den bereit stehenden Polarisationsapparat und polarisiert, indem man wieder die Zeit notiert.

Wenn man schnell operiert, gelingt es, 5—7 Minuten nach der Auflösung die erste Polarisation auszuführen und zu konstatieren, ob Multirotation vorhanden ist, und bei den weiteren Ablesungen sieht man, ob die Drehung sich verändert. (Siehe *Parcus* und *Tollens* [1]), *Hammerschmidt* [2]), *Osaka* [3]).

Wenn Konstanz eingetreten ist, berechnet man (α)D nach den oben angegebenen Formeln.

e) Polarisationsapparate.

In *Landolts* Buch sowie in dem ebenfalls sehr empfehlenswerten Buche von *Frühling* [4]) (früher *Frühling* und *Schulz*) findet man die genauen Beschreibungen der Polarisationsapparate (siehe z. B. Fig. 8).

Hier möge nur angegeben werden, daß die gebräuchlichen Apparate nach zwei verschiedenen Prinzipien konstruiert sind, sie geben nämlich einerseits direkt die Drehung der Polarisationsebene in Graden des Kreises an, und andrerseits sind Apparate im allgemeinen Gebrauche, bei welchen die durch die Zuckerlösung bewirkte Drehung nicht direkt, sondern durch Kompensation, d. h. durch Einschiebung von mehr oder weniger einer entgegengesetzt der Zuckerlösung drehenden Substanz, bis die Drehung aufgehoben ist, gemessen wird; diese Apparate besitzen Skalen, deren Teile man auf Kreisgrade umrechnen kann.

---

[1]) *E. Parcus* und *B. Tollens*, Über die Mehr- oder Wenigerdrehung (Multirotation oder sog. Birotation und Halbrotation) der Zuckerarten. Ann. Chem. Vol. **257**. S. 160 (1890).

[2]) *Hammerschmidt*, Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1880**. S. 939.

[3]) *Yukichi Osaka*, Über die Birotation der d-Glukose. Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. **35**. S. 663 (1900).

[4]) *R. Frühling*, Anleitung zur Untersuchung der für die Zuckerindustrie in Betracht kommenden Rohmaterialien, Produkte usw. 6. Aufl. Braunschweig 1903.

Die entgegengesetzt drehende Substanz ist der wasserhelle Quarz oder Bergkristall, von welchem bekanntlich rechtsdrehende und linksdrehende Varietäten vorkommen.

Eine spitz keilförmig geschliffene Quarzplatte wird in dem Apparate hin und her geschoben, bis die jeweilig im Gesichtsfelde befindliche Dicke gerade die Drehung der Zuckerlösung tilgt oder kompensiert, und eine auf dem Quarzkeil befindliche Skala zeigt die erforderlich gewesene Verschiebung an.

Diese ursprünglich von Soleil und Dubosq hergestellten „Quarzkeilapparate" werden in den Zuckerfabriken ganz allgemein angewandt, und

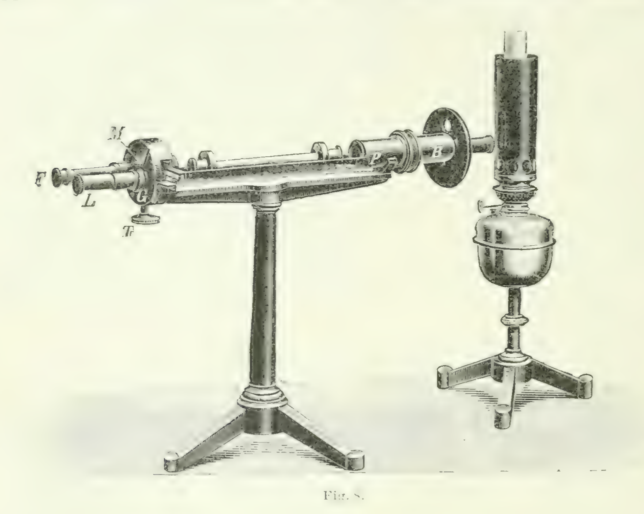


Fig. 8.

sie sind in der Anwendung viel bequemer als die Apparate, welche direkt Grade des Kreises angeben.

Die Skala der Quarzkeilapparate ist von mehr oder weniger willkürlicher Art, und sie wird den Zwecken, zu welchen die Apparate dienen sollen, angepaßt. Wenn der Apparat in den Fabriken zur Ermittlung des Rohrzuckers dienen soll, ist die Skala nach *Ventzke-Scheiblers* Vorgange in Deutschland so geteilt, daß sie um 100 Teile verschoben werden muß, wenn eine Lösung von 26·048 *g* Rohrzucker, d. h. das „Normalgewicht"[1], in Wasser zu 100 *cm*³ im 200 *mm*-Rohr im Apparate liegt (oder von 26 *g* Rohrzucker in Wasser zu 100 „wahren" Kubikzentimetern); folglich

[1]) In Frankreich ist ein anderes „Normalgewicht", nämlich 16·29 *g* oder auch 16·35 *g* Rohrzucker auf 100 *cm*³ gebräuchlich, dies gibt in den französischen Apparaten eine Skalenverschiebung von 100 Teilen, und folglich zeigt ein solcher Skalenteil 0·1629 resp. 0·1635 *g* Zucker an (s. auch *Landolt*, Opt. Drehungsverm. S. 333 Anm.).

zeigt jeder Verschiebungsteil der Skala 0·26048 *g* Rohrzucker in 100 *cm*³ Flüssigkeit an.

Nach der oben gegebenen Formel $(\alpha) D = \frac{\alpha V}{c . l}$ dreht im Kreisgradapparate eine Lösung von 26·048 *g* Rohrzucker in 100 *cm*³ im 200 *mm*-Rohr nach der Rechnung:

$$66{\cdot}5 = \frac{\alpha . 100}{26{\cdot}048 . 2}$$

oder

$$\alpha = \frac{66{\cdot}5 . 26{\cdot}048 . 2}{100} = 34{\cdot}64,$$

34·64 Grade; folglich sind 100 Skalenteile des Quarzkeilapparates entsprechend 34·64 Graden des Kreises, und man muß die Skalenteile mit 0·346 multiplizieren, um Kreisgrade zu erhalten.

Die oben angegebene Formel zur Ermittlung der spezifischen Drehung:

$$(\alpha) D = \frac{\alpha . V}{c . l} \text{ wird folglich zu } (\alpha) D = \frac{\alpha' . 0{\cdot}346 . V}{c . l},$$

worin α' die abgelesene Skalenverschiebung oder Skalengrade bedeutet.

Wenn es sich, wie vielfach bei physiologischen Untersuchungen (z. B. beim Harn), darum handelt, den Prozentsatz an Zucker in Flüssigkeiten zu bestimmen, benutzt man für den Quarzkeil-Apparat die Formel $c = \frac{\alpha' . 0{\cdot}346 . V}{(\alpha) D . l}$, worin $(\alpha) D$ der Glukose $= + 52—53^0$, und aus welcher sich für je 1 Skalenteil der Ablenkung 0·333—0·326 *g* Glukose in 100 *cm*³ ergibt.

Bequemer aber ist es, zur Berechnung davon auszugehen, daß bei Anwendung des 200 *mm*-Rohrs 1 Skalenteil 0·26048 *g* Rohrzucker in 100 *cm*³ entspricht, und zu bedenken, daß diejenigen Quantitäten verschiedener Zuckerarten, welche gleiche Drehung bewirken, im umgekehrten Verhältnis ihrer spezifischen Drehungen stehen müssen.

Folglich entspricht 1 Skalenteil der obigen Quarzkeilapparate bei 200 *mm* langer Beobachtungsröhre nach $53 : 66{\cdot}5 = 0{\cdot}26048 : x$ oder nach $\frac{0{\cdot}26048 . 66{\cdot}5}{53} = 0{\cdot}3268$ *g* Glukose oder nach $\frac{0{\cdot}26048 . 66{\cdot}5}{81} = 0{\cdot}2138$ *g* Galaktose in 100 *cm*³ Flüssigkeit, und durch das spezifische Gewicht der Flüssigkeit dividiert, dem Prozentgehalt.

Die Skalen der Quarzkeilapparate sowie der Kreisdrehungsapparate sind jedoch zuweilen anders eingerichtet; z. B. ist, damit man ohne Rechnung im Harn die Glukose bestimmen kann, die Skala dann derart geteilt, daß man direkt „Prozente" (richtiger wohl sog. „Volumprozente", d. h. Gramm Zucker in 100 *cm*³ Flüssigkeit) abliest, wenn man die Lösung im 200 *mm*-Rohr eingelegt hat.

Die Beschreibungen und Prospekte der Fabrikanten, z. B. Schmidt & Haensch in Berlin, geben das Nähere an.

Um möglichste Genauigkeit beim Ablesen sowohl des Standes des Apparates ohne die eingelegte Röhre mit der Zuckerlösung, d. h. des sogenannten „Nullpunktes“, als auch bei eingelegter Röhre zu erreichen, ist bei sämtlichen neueren Apparaten das Gesichtsfeld ein geteiltes, das heißt aus 2 (oder 3) Teilen bestehendes, und diese Felder muß man sowohl bei leerem Apparate als auch nach Einschaltung der Röhre mit der Zuckerlösung zur Gleichheit bringen, und zwar zur Gleichheit der Helligkeit, oder vielmehr, da bei der Gleichheit der Gesichtsfelder — der Empfindlichkeit halber — möglichst wenig Licht vorhanden sein muß, zur gleichen Beschattung. Folglich werden diese Apparate „Halbschattenapparate“ genannt.[1])

Als genauester Halbschattenapparat mit direkter Kreisgradablesung ist der von *Landolt* vervollkommte Apparat nach *Lippich* zu betrachten, und als bequemster der Schmidt & Haenschsche Quarzkeil-Halbschattenapparat.

Bei beiden Apparaten ist das dreiteilige Gesichtsfeld, bei welchem der mittlere Teil einerseits und die beiden Seitenteile andrerseits bei der Drehung des Okularteiles oder beim Verschieben des Quarzkeiles die Helligkeit wechseln, bis sie schließlich gleich „beschattet“ sind, dem zweiteiligen Gesichtsfelde vorzuziehen, weil bei dem letzteren die Beurteilung der Gleichheit schwerer ist, und weil veränderte Stellung der Lichtquelle leicht geringe Differenzen der Beschattung hervorbringen kann.

Bei den Apparaten mit Kreisgradablesung muß man homogenes Licht, d. h. Licht von nur einer Farbe und möglichst derselben Wellenlänge anwenden, und man benutzt stets Licht, welches durch eine mit Kochsalz gelb gefärbte und sonst nicht leuchtende Flamme hervorgebracht ist, und welches durch eine im Apparate angebrachte Platte oder Lösung von rotem Di-Kaliumchromat, $K_2Cr_2O_7$, völlig homogen gemacht wird.

Bei den Quarzkeilapparaten benutzt man dagegen eine möglichst helleuchtende Gasflamme, deren Licht aber durch eine im Apparat angebrachte Lösung von Kaliumchromat ebenfalls gelb gefärbt wird. Elektrisches Licht kann auch angewendet werden.

Das hellere Licht, welches bei den Quarzkeilapparaten angewendet werden kann, macht, besonders bei nicht ganz hellen Lösungen, das Beobachten leichter als bei den Kreisgradapparaten, und das Ablesen ist bei dem neuen Schmidt & Haenschschen Quarzkeilapparat sehr viel leichter und bequemer auszuführen als bei anderen Apparaten.

Freilich ist zur Erreichung der höchsten Genauigkeit bei der Ermittlung der spezifischen Drehung einer Substanz die sorgfältige An-

[1]) In den ursprünglichen *Soleil-Dubosq*schen und auch in den in Deutschland früher allgemein benutzten *Ventzke-Scheibler*schen Quarzkeilapparaten wurde durch eine sog. Doppelplatte aus Rechts- und Linksquarz und ein drittes *Nicol*sches Prisma, welches drehbar war, ein farbiges geteiltes Gesichtsfeld hervorgebracht, und man mußte die beiden Hälften des Gesichtsfeldes auf Farbengleichheit einstellen. Diese „Farbenapparate“ verschwinden jetzt allmählich, da die Halbschattenapparate ein genaueres und bequemeres Arbeiten auch farbenblinden Leuten gestatten.

wendung der Kreisgradapparate und speziell des *Landolt-Lippich*schen anzuraten, weil die Zahl 0·346, mit welcher die Skalenteile des Quarzkeilapparates multipliziert werden müssen (siehe oben), vielleicht nicht für alle Substanzen ganz richtig ist. Es rührt dies daher, daß das Farben-Dispersionsvermögen mancher Substanzen etwas verschieden ist; für die Zuckerarten ist es jedenfalls nahezu gleich, und die Zahl 0·346 wenigstens sehr annähernd richtig.

f) Ausführung der Polarisationen.

Bei jeder Polarisation sind als erste Bedingungen des Gelingens und der Genauigkeit die völlig klare Durchsichtigkeit der Flüssigkeit und möglichst geringe Färbung der Flüssigkeit hervorzuheben.

Man muß also die Flüssigkeiten vorher gut filtrieren, und am sichersten setzt man, um auch die feinsten Teile, z. B. Bakterientrübungen, zu beseitigen, den Lösungen etwas aus Alaun oder Aluminiumsulfat mit Ammoniak gefälltes und gut ausgewaschenes, unter Wasser aufbewahrtes Aluminiumhydroxyd zu, welches beim Filtrieren die trübenden Teile einschließt, so daß sie nicht durch das Filter gehen.

Vorhandene Färbungen kann man meistens durch Schütteln oder Erwärmen der Flüssigkeiten mit Blutkohle beseitigen, doch muß man bedenken, daßdie Kohle auch etwas der Zuckerarten zurückhalten kann.[1])

Hat man mit Pflanzensäften, Harn oder ganz undurchsichtigen unreinen Flüssigkeiten zu tun, muß man sie vor dem Polarisieren klären (siehe S. 50) und dies geschieht meistens mit Bleiessig, welcher Phosphorsäure, Gerbstoff, Eiweiß- und Farbstoffe usw. als dicken Niederschlag abscheidet; man erhält dann ein klares Filtrat, welches sich sehr gut polarisieren läßt. Natürlich muß man die ursprüngliche Lösung und den zugesetzten Bleiessig abmessen und die nachher abgelesene Polarisationszahl im Verhältnis der durch den Bleiessigzusatz entstandenen Volumvergrößerung auch vergrößern. Hat man z. B. zu 100 cm^3 Pflanzensaft 10 cm^3 Bleiessig gesetzt, so multipliziert man die Polarisationszahl mit $\frac{110}{100}$, d. h. man rechnet $^1/_{10}$ der Zahl zu.

Auch andere Klärmittel, wie trockenes basisches Bleiacetat, Phosphorwolframsäure, Zinkacetat, Eisenoxydsulfat mit Natriumkarbonat, Eisenchlorid, Kupfersulfat und Natriumhydroxyd, Jodkalium-Quecksilberjodid, Quecksilbernitrat, sind brauchbar, und ebenfalls andere derartige Fällungsmittel für Eiweiß-, Gerb- und andere Stoffe, falls sie nicht selbst polarisierend wirken.

Wenn man mit Lösungen zu tun hat, in welchen nur eine Zuckerart vorhanden ist, kommt man mit den obigen Rechnungen zum Ziel; sind jedoch mehrere Zuckerarten zugleich vorhanden, so kann man aus der Polarisation nur wenig oder gar nichts schließen, weil die Einzelpola-

[1]) Siehe S. 53, sowie *R. O. Herzog* und *J. Adler*, Über die Adsorption von Zuckerarten durch Tierkohle. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60. S. 79 (1909).

risationen sich summieren, und man nicht weiß, welchen Anteil an der beobachteten Drehung die einzelnen Zucker bewirkt haben.

Man kann jedoch zum Ziele kommen, wenn man auf andere Art, etwa durch *Fehling*sche Lösung, Kenntnis von der Summe der vorhandenen Zuckerarten gewinnt oder, wenn man, etwa durch hydrolytische Inversion, einen oder auch beide Zuckerarten in gesetzmäßiger und bekannter Weise in der Polarisationskraft verändert und in der so erhaltenen neuen Lösung wieder die Polarisation bestimmt. Es sind dies feine Operationen, welche mit großer Genauigkeit ausgeführt werden müssen, welche dann aber auch zum Ziele führen. Als Beispiel der ersten Art möge die Bestimmung von Glukose und Fruktose in derselben Lösung angeführt werden, und Beispiele der zweiten Art sind die sogenannten Inversionspolarisationen des Rohrzuckers, die Bestimmung der Raffinose neben Rohrzucker, die Bestimmung des Milchzuckers neben Rohrzucker (siehe später).

Wie man in der Algebra bei der Ermittlung von zwei unbekannten Größen (x und y) zwei Gleichungen nötig hat, so sind auch hier die Resultate von zwei nach verschiedener Art ausgeführten Bestimmungen erforderlich.

Zum Zwecke der Zuckerbestimmung können außer der Polarisation und den Bestimmungen mittelst *Fehling*scher Lösung auch andere chemische Prozesse benutzt werden. Hierher gehören teilweise die Fällungen mit Phenylhydrazinen, welche bei den qualitativen Reaktionen beschrieben sind, ferner die Überführung der Pentosen und Pentosane sowie der Glukuronsäure in Furfurol und Bestimmung des letzteren; analog ist weiter die Ermittlung der Methylpentosen durch Bestimmung des Methylfurfurols.

Durch Oxydation mittelst Salpetersäure von 1·15 spez. Gew. kann man die Galaktose sowohl frei als auch in Verbindungen aus der entstehenden Schleimsäure bestimmen usw.

Im folgenden werden diese näher beschrieben.

g) Spezielle Angaben über quantitative Bestimmungen einzelner Zuckerarten.

1. Pentosen, $C_5H_{10}O_5$, und Pentosane, $C^5H^8O^4$, Arabinose und Xylose sowie als Anhang Glukuronsäure.

α) Arabinose und Xylose.

l-Arabinose besitzt eine sehr hohe Rechtsdrehung, und ferner ist beträchtliche Mehrdrehung vorhanden.

Bei 20° C ist nach *v. Faber* und *Tollens* ihre spezifische Drehung oder

$$(\alpha)D = +108{\cdot}2 - 0{\cdot}4\,p + 0{\cdot}014\,p^2,$$

worin p den Prozentgehalt der Lösung an Arabinose bedeutet, also in 10%iger Lösung = + 105·6°.[1])

[1]) *v. Faber*, Die spezifische Drehung der l-Arabinose. Zeitschr. f. angew. Chem. Jg. **1899**. S. 962.

Die isomere d-Arabinose, das Antilogon oder Spiegelbild der l-Arabinose, dreht genau so viel nach links [(α) D = — 105°] wie die l-Modifikation nach rechts.

Die razemische Verbindung beider, i- oder r-Arabinose, ist ganz inaktiv, sie kann also nicht durch Polarisation bestimmt werden.

l-Xylose dreht nach rechts, aber viel weniger als die l-Arabinose, sie besitzt eine sehr hohe Mehrdrehung, denn ihre spezifische Drehung ist gleich nach der Auflösung = + 80—85°, nachher jedoch ungefähr + 19°.

Die genaue Zahl für die konstante spezifische Drehung ist (α) D = + 18·1 + 0·07 p, also in 10%iger Lösung = + 18·8°[1]), die Temperatur ist kaum von Einfluß.

Zur Bestimmung der Arabinose kann man die Fällung mit Di-Phenylhydrazin benutzen, indem man nach *Neuberg*[2]) sowie nach *Maurenbrecher* und *Tollens*[3]) die betreffenden Sirupe mit etwas mehr als der voraussichtlich erforderlichen Menge Di-Phenylhydrazin, etwas Wasser und so viel starkem Alkohol versetzt, daß in der Kälte Lösung des Di-Phenylhydrazins eintritt. Man kann auch salzsaures Diphenylhydrin mit der äquivalenten Menge essigsauren Natriums anwenden. Nach ½stündigem Kochen im Wasserbade am Rückflußkühler scheidet sich das Arabinose-Di-Phenylhydrazon ab, welches man nach dem Abkühlen und einigem Stehen absaugt, wäscht, trocknet und nach

$$C_5H_{10}O_4 . N . N(C_6H_5)_2 \; : \; C_5H_{10}O_5$$

auf Arabinose umrechnet.

Die Fällungen mittelst Bromphenylhydrazin und anderer Hydrazine sind weniger zur Bestimmung geeignet, doch kann man nach *Ruff* und *Ollendorff*[4]) zur möglichst quantitativen Trennung von Arabinose und Xylose das Benzylphenylhydrazin benutzen. Man löst hierzu das Gemenge der beiden Pentosen in 8 Teilen 75%igem Alkohol, setzt etwa die berechnete Menge Benzylphenylhydrazin zu, saugt nach 12 Stunden das Arabinose-Benzylphenylhydrazin ab und fällt das Xylose-Benzylphenylhydrazin aus der Mutterlauge durch Wasser aus, oder man gewinnt es durch Verdunstung.

Aus den Hydrazonen stellt man durch Zersetzung mit Formaldehyd die freien Pentosen dar.

---

[1]) *C. Schulze* und *B. Tollens,* Untersuchungen über das Holzgummi (Xylan) und die Pentosane als Bestandteil der inkrustierenden Substanzen der verholzten Pflanzenfasern. Landw. Vers.-Stat. Bd. **40**. S. 367 (1892).

[2]) *Carl Neuberg*, Über die Harnpentose, ein optisch inaktives, natürlich vorkommendes Kohlehydrat. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 2243 (1900); *J. Wohlgemuth,* Über d-Arabinose, d-Arabonsäure und die quantitative Bestimmung von Arabinose. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **35**. S. 38 (1902).

[3]) *A. D. Maurenbrecher* und *B. Tollens*, Untersuchungen über die Kohlehydrate des Kakaos. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **39**. S. 3578 (1906).

[4]) *Otto Ruff* und *Gerhard Ollendorff,* Verfahren zur Reindarstellung und Trennung von Zuckern. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 3234 (1899).

Auch das Naphtyl-Phenylhydrazon ist nach *Hilger* und *Rothenfusser*[1]) zur Fällung der Arabinose brauchbar, indem das Hydrazon der Xylose in Lösung bleibt.

β) Furfurol-Salzsäure-Destillationsmethode.

Vielfach benutzt man zur Arabinosebestimmung die Furfurol-Salzsäure-Destillationsmethode, bei welcher (siehe oben) die Arabinose Furfurol liefert. Leider entsteht erheblich weniger Furfurol als der früher gegebenen Gleichung entspricht, weil ein Teil der Arabinose oder des entstandenen Furfurols sich unter Bildung brauner sogenannter Huminsubstanzen zersetzt und der Wägung entzieht.

Um immer denselben Anteil Furfurol oder Furfurol-Phlorogluzid aus derselben Menge Arabinose zu erhalten, was für die quantitative Bestimmung erforderlich ist, muß man bei der Destillation immer genau dieselben Bedingungen sorgfältig innehalten, welche in Göttingen nach und nach ausgearbeitet sind.[2])

Derselbe Apparat und dieselben Bedingungen dienen auch zur Bestimmung der Xylose und der Glukuronsäure, und der Unterschied in der Bestimmung dieser Stoffe liegt nur in der Art der Berechnung des Furfurol-Phlorogluzids auf Arabinose, Xylose, Gemenge von diesen beiden oder „Pentose im allgemeinen“ oder auf Glukuronsäure.

Der Pentosen-Destillationsapparat (siehe S. 131, Fig. 9) besteht aus einer ca. 300 cm^3 enthaltenden weithalsigen Kochflasche mit Aufsatz, dem einfachen Kühler und einigen 40 cm^3 fassenden Zylinderchen mit Marke bei 30 cm^3. Die Kochflasche wird in emaillierten Metallschälchen mit leicht (ungefähr bei 100°) schmelzbarem Metall erhitzt, sie trägt in dem sie verschließenden Kautschukstopfen das Ableitungsrohr für die Dämpfe, welches nach Art des Destillationsrohres bei *Kjeldahls* Stickstoffapparat, um Überspritzen zu verhindern, aus einer Kugel mit innerem Rohr besteht, und ferner trägt sie zum Nachgießen von Flüssigkeit eine Hahnpipette, deren Ausfluß bis in die Mitte der Kochflasche reicht.

Der Kühler kann von beliebiger Konstruktion sein, besteht jedoch bequemerweise aus einem Blechkasten, durch welchen schräg eine oder, falls man mehrere Furfuroldestillationen zu gleicher Zeit ausführen will, mehrere Röhren aus böhmischem Glase passieren, deren Ausläufe etwas verengt und abwärts gebogen sind. Die Auffangszylinder werden darunter gestellt.

[1]) *A. Hilger* und *S. Rothenfusser*, Über die Bedeutung der β-Naphtylhydrazone der Zuckerarten für deren Erkennung und Trennung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 4444 (1902).

[2]) Siehe u. a. die Abhandlung *Kröbers*, Untersuchungen über die Pentosenbestimmungen mittelst der Salzsäure-Phlorogluzinmethode nebst einigen Anwendungen I. und II. im Journ. f. Landwirtsch. Jg. **1900**. S. 355 und Jg. **1901**. S. 7, in welcher die von *Tollens* und seinen Mitarbeitern *Stone, de Chalmot, Günther, Mann, Flint, Krüger, Rimbach* ausgeführten Versuche zitiert sind.

In *Königs* Handbuch ist die Anordnung von vier Destillationsapparaten beschrieben, und *Rudno Rudzinski* [1]) arbeitete gleichzeitig mit sechs Apparaten.

Man bringt die zu untersuchende abgewogene Substanz (Stroh, Holz, Gummi, Organe irgend welcher Art) in die Kochflasche, setzt 100 cm^3 Salzsäure von 1·06 spez. Gew. (ca. 12% HCl) hinzu, erhitzt das Metallbad, bis der Inhalt der eintauchenden Kochflasche zum lebhaften Kochen kommt, und destilliert, bis 30 cm^3 Furfurol enthaltende Flüssigkeit übergegangen

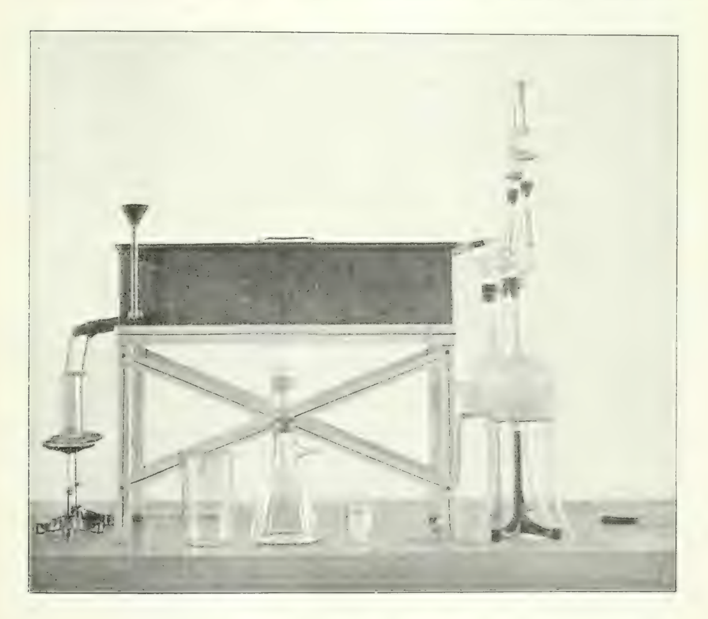


Fig. 9.

sind. Diese gießt man in ein Becherglas mit Marke bei 400 cm^3, und das ursprüngliche Flüssigkeitsvolum in der Kochflasche stellt man wieder her, indem man durch die Hahnpipette 30 cm^3 derselben Salzsäure von 1·06 spez. Gew. einfließen läßt. Man destilliert jetzt wieder 30 cm^3 Flüssigkeit ab, läßt 30 cm^3 einfließen usw., bis die Substanz völlig zersetzt ist, und kein Furfurol mehr übergeht. Meistens sind 9—12 solche, je 10—11 Minuten dauernde Destillationen erforderlich.

---

[1]) *Albin v. Rudno Rudzinski*, Über die Bedeutung der Pentosane als Bestandteile der Futtermittel, insbesondere des Roggenstrohes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **40**. S. 332 (1903/1904).

Um zu sehen, ob Furfurol in den Destillaten vorhanden ist, benutzt man eine Lösung von Anilinacetat, welche man sich durch Zusammengießen gleicher Volume Anilin und Wasser und tropfenweisen Zusatz von Essigsäure, bis eben die Flüssigkeit klar geworden ist, herstellt (siehe S. 85).

Man bringt mit einem Glasstabe einen Tropfen dieser Lösung auf einen Streifen Filtrierpapier und dann einen Tropfen des destillierenden Liquidums neben den Anilinacetatfleck, so daß die beiden ineinander laufen.

Wenn keine rote Reaktion mehr auftritt, bricht man die Destillation ab.

Die im Becherglase gesammelten Destillate versetzt man mit ungefähr so viel in etwas Salzsäure von 1·06 spezifischem Gewicht gelösten Phlorogluzin puriss. Merck, wie man Arabinose vermutet, und füllt mit Salzsäure von 1·06 spezifisches Gewicht zu 400 cm^3 auf.

Die Flüssigkeit färbt sich sofort gelb, dann grünlich, sie wird trübe, und am folgenden Morgen hat sich das grünschwarze Furfurol-Phlorogluzid abgesetzt. Man prüft, ob die überstehende Flüssigkeit Anilinacetatpapier nicht rötet, ob also alles Furfurol gefällt ist, und sammelt das Phlorogluzid in einem Goochtiegel.

Ein Porzellan-Goochtiegel wird mit einer dünnen Asbestschicht versehen, einige Male mit Salzsäure ausgewaschen, dann getrocknet und geglüht (das Glühen geschieht am einfachsten und sichersten in einer mit Gas geheizten Muffel aus Ton). Man setzt dann den fast abgekühlten Tiegel in ein weithalsiges Filterwägeglas, schließt dieses mit seinem Stöpsel, setzt es in den Exsikkator über Schwefelsäure und wägt das Filterwägeglas mit dem darin befindlichen Tiegel nach völligem Erkalten.

Man filtriert zuerst die obenstehende Flüssigkeit, dann den Niederschlag auf der Saugflasche ab, wäscht mit 150 cm^3 Wasser nach und trocknet den Tiegel 4 Stunden lang im Wassertrockenschrank bei ca. 97°, hierbei legt man die Tiegel auf die Seite, um die Löcher des Bodens frei zu halten.

Dann läßt man den wieder in das Filterwägeglas gesetzten Tiegel im Exsikkator erkalten und wägt.

Der Tiegel wird dann durch Ausglühen in der Muffel von Phlorogluzid befreit und ist zu neuem Gebrauch fertig.

Aus dem Phlorogluzid ergeben sich das Furfurol und auch die Arabinose, Xylose (sowie die Glukuronsäure, s. u.), welche ihm entsprechen, und am besten benutzt man hierzu die Formeln und die Tabelle von *Kröber*, welcher durch mühsame Versuche die bei obigem Arbeiten aus der Arabinose und der Xylose zu erhaltenden Mengen Phlorogluzid ermittelt hat.

Die als Anhang folgende große Tabelle *Kröbers* findet sich im Journal für Landwirtschaft [1]), in der Zeitschrift für physiologische Chemie [2])

[1]) *Kröber* a. a. O. Journal f. Landwirtsch. Jg. **1900**. S. 379—384.

[2]) *E. Kröber*, Tabelle zur Umwandlung von Phlorogluzid in Furfurol, Pentosan usw., s. *B. Tollens*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. Beilage zu Heft II/III.

und in *Königs* Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. Berlin 1903. 3. Aufl. S. 1002—1006.

In dieser Tabelle befindet sich neben Arabinose auch Araban, d. h. die als $C_5 H_8 O_4$ angenommene Muttersubstanz der Arabinose, welche in den Pflanzen vorkommt, und andere Rubriken bringen Xylose, $C_5 H_{10} O_5$, und Xylan, $C_5 H_8 O_4$. Endlich ist noch eine Rubrik „Pentose" und eine andere „Pentosan" vorhanden.

Man wendet die beiden letzteren an, wenn man nicht weiß, ob in den Naturprodukten Araban oder Xylan vorhanden ist, d. h. ob Arabinose oder Xylose hydrolytisch aus ihnen zu erhalten ist. Diese Rubriken 7 und 8 sind die Mittelwerte von 3 und 5 und von 4 und 6, und ihre Zahlen werden in sehr vielen Fällen der Wahrheit am nächsten kommen.

Es ist zu der Tabelle zu bemerken, daß sie die Zahlen für 30—300 *mg* Furfurol-Phlorogluzid enthält, d. h. für die Mengen, welche man gewöhnlich und bei passenden Mengen des angewandten Materiales bekommt. Beträgt das Phlorogluzid weniger als 0·030 *g*, so rechnet man es nach den folgenden Formeln, in welchen a das Phlorogluzid bedeutet, um:

Furfurol $= (a + 0{\cdot}0052) . 0{\cdot}5170$
Pentose im allgemeinen $= (a + 0{\cdot}0052) . 1{\cdot}0170$
Pentosan im allgemeinen $= (a + 0{\cdot}0052) . 0{\cdot}8949$

Beträgt es mehr als 0·300 *g*, so rechnet man

Furfurol $= (a + 0{\cdot}0052) . 0{\cdot}518$
Pentose im allgemeinen $= (a + 0{\cdot}0052) . 1{\cdot}0026$
Pentosan im allgemeinen $= (a + 0{\cdot}0052) . 0{\cdot}8824$

In diesen Formeln bedeutet 0·0052 die bei der angegebenen Art zu arbeiten, regelmäßig in den Lösungen bleibende Menge (5·2 *mg*) Phlorogluzid.

Die Methode ist genau wie oben beschrieben oder auch in anderer Form (siehe *Grund* auf S. 134) vielfach mit pflanzlichen Substanzen und auch mit Stoffen tierischer Herkunft [1]) mit stetem guten Erfolg ausgeführt, und sie genießt allgemeines Vertrauen.

Und doch sind Bedenken gegen die völlige Richtigkeit derselben anzuführen, nämlich erstens das Bedenken, daß neben den Pentosanen der Natur vielfach Methylpentosane vorkommen, welche sich beim Destillieren mit Salzsäure analog verhalten wie die Pentosane, d. h. sie geben Methyl-Furfurol; dies wird durch Phlorogluzin ebenso wie das Furfurol gefällt und vermehrt das Gewicht des Phlorogluzids.

Diese Bedenken beseitigt man, wenn man (siehe weiter unten) auf die bei Rhamnose und Fukose beschriebene Weise das Methylfurfurol-Phlorogluzid von dem Furfurol-Phlorogluzid mittelst Alkohols trennt und beide für sich bestimmt.

[1]) Z. B. *Ernst Bendix* und *Erich Ebstein*, Über den Pentosengehalt tierischer und menschlicher Organe. Zeitschr. f. allgem. Physiologie. Bd. 2. S. 1 (1902).

Schwerer wiegt ein zweites Bedenken, nämlich, daß Furfurol auch aus anderen Stoffen als Pentosen entsteht, so aus anderen Kohlenhydraten, aus Glukuronsäure und aus Oxyzellulosen.

Hier ist zu bemerken, daß Stärke, Glukose, Milchzucker nur sehr wenig Furfurol liefern, also von geringem Einfluß sein werden, und daß ferner der Einfluß der Glukuronsäure bestimmt werden kann (siehe weiter unten).

Der Einfluß der Oxyzellulosen, welche durch verschiedene Oxydationsmittel aus Zellulose gebildet werden oder auch sich in den Pflanzen finden[1]), und welche nicht unbedeutende Mengen Furfurol liefern, ist einstweilen nicht zu bestimmen, da die Oxyzellulosen wenig bekannt und nicht frei von Zellulose zu gewinnen sind, und man folglich nicht weiß, wie viel Furfurolprozente aus der reinen Oxyzellulose entstehen.

Trotz dieser Bedenken wird aber, da andere Methoden fehlen, diese Pentosen- oder Pentosanbestimmungsmethode allgemein angewandt, und der Vorschlag von *Cross* und *Bevan*, nicht von „Pentosanen" zu sprechen, sondern nur von „Furfuroiden" oder „Furfurol gebenden Substanzen", wird meistens nicht befolgt.

Die oben angegebene Methode der Pentosan- und Pentosenbestimmung ist von *Grund*[2]) etwas abgeändert worden. Er wendet nicht 300 cm^3 Salzsäure von 1·06 spez. Gew., sondern 500 cm^3 an, destilliert jedesmal nicht 30 cm^3, sondern 50 cm^3, ab und gießt jedesmal 50 cm^3 Salzsäure zu.

Das Abdestillieren von 200 cm^3 soll genügen, es wird das Filtrieren des Destillates vor der Phlorogluzinfällung empfohlen.

Zur Umrechnung des Phlorogluzides auf Pentosen gibt *Grund* folgende Formeln:

$$\text{Phlorogluzid} \times 1{\cdot}148 + 0{\cdot}0025 = \text{Arabinose},$$
$$\text{Phlorogluzid} \times 1{\cdot}045 + 0{\cdot}00305 = \text{Xylose}.$$

Um das beim Destillieren der Pentosen mit Salzsäure entstandene Furfurol in wägbare Form zu bringen, haben *Jäger* und *Unger*[3]) sowie neuerdings *Fromherz*[4]) empfohlen, nicht Phlorogluzin, sondern Barbitursäure anzuwenden, welche mit Furfurol einen gelben kristallinischen Niederschlag bildet:

$$\underset{\text{Barbitursäure}}{C_4H_4N_2O_3} + \underset{\text{Furfurol}}{C_5H_4O_2} = \underset{\text{Niederschlag.}}{C_9H_6N_2O_4} + H_2O$$

[1]) *C. F. Cross, E. J. Bevan* und *C. Beadle*, Die natürlichen Oxyzellulosen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **27**. S. 1061 (1894). — *Léo Vignon*, Sur l'oxycellulose. Bull. Soc. chim. (3.) T. **19**. p. 790 (1898). — *O. v. Faber* und *B. Tollens*, Untersuchungen über die Oxyzellulose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 2589 (1899).

[2]) *Georg Grund*, Über den Gehalt des Organismus an gebundenen Pentosen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **35**. S. 111 (1902).

[3]) *Richard Jäger* und *Ernst Unger*, Über Pentosenbestimmung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 4440 (1902); Jg. **36**. S. 1222 (1903).

[4]) *Konrad Fromherz*, Zur quantitativen Bestimmung des Methylfurols. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **50**. S. 241 (1906/1907).

Der Niederschlag wird nach 24 Stunden in Goochtiegeln abfiltriert, 4 Stunden bei 105° getrocknet, gewogen und mit Berücksichtigung von 4·9 *mg*, welche in 400 *cm*³ Destillat gelöst bleiben, nach $C_9H_6N_2O_4 : C_5H_4O_2$ auf Furfurol berechnet.

Das Barbitursäureverfahren soll reinere Niederschläge liefern als das Phlorogluzinverfahren; ob dies der Fall ist, sei dahingestellt.

Jolles[1]) hat eine andere Art der Pentosenbestimmung gegeben, welches auch auf der Bildung von Furfurol und Bestimmung des letzteren beruht, sich aber dadurch von der *Tollens*schen unterscheidet, daß die Destillation anders gestaltet wird, und daß die Bestimmung des Furfurols nicht durch Wägung als Phlorogluzin, sondern durch Titrierung mit Jodlösung nach Bindung des Furfurols an Natriumbisulfit erfolgt.

Man bringt die Pentose oder die Pentosan haltende Substanz in einen $1^1/_2\,l$ enthaltenden Kolben mit 200 *cm*³ Salzsäure von 1·06 spezifischem Gewicht und leitet aus einem anderen Kolben Wasserdampf ein, während man den ersten Kolben ebenfalls so erhitzt, daß die Flüssigkeit nicht unter 100 *cm*³ sinkt. Das Destillat soll 2—3 *l* betragen, und so lange wird destilliert, bis 1 *cm*³ des Destillates mit 4 *cm*³ des *Bial*schen Orzinreagenz (s. S. 97) keine Färbung zeigt.

Bei diesem Übertreiben des entstehenden Furfurols mit Wasserdampf soll keine Huminbildung stattfinden und die theoretische Menge Furfurol entstehen. Von der abgemessenen großen Menge Destillat nimmt man 100 *cm*³ zur Titrierung; man neutralisiert mit Natronlauge, setzt allmählich einige Tropfen Halbnormal-Salzsäure zu, bis Methylorange eben gerötet wird, gibt eine überschüssige Menge Natriumbisulfit hinzu, läßt 2 Stunden stehen, gibt dann $^1/_{10}$-Normal-Jodlösung zu, bis die (später zugesetzte) Stärkelösung gebläut wird.

Man gebraucht weniger Jodlösung als der zugesetzten Bisulfitlösung ursprünglich entsprach, und diese Differenz ist ein Maß für das vorhandene Furfurol. Die Reaktion zwischen Furfurol und Natriumbisulfit geht nach *Jolles* nach folgender Gleichung vor sich:

$$C_4H_3O.CHO + NaHSO_3 = C_4H_3O.CH\left\langle{OH \atop SO_3Na}\right.$$

Ob das Arbeiten nach *Jolles* mit stundenlangem Destillieren ganzer Liter Flüssigkeit und der Titration einer kleinen Flüssigkeitsmenge und dem Umrechnen auf das ganze, gegenüber der einfachen Furfuroldestillationsmethode von *Tollens* und dem Filtrieren und Trocknen des Furfurol-Phlorogluzids Vorteile besitzt, ist zu bezweifeln.

γ) Methyl-Pentosen, $C_6H_{12}O_5$, und Methyl-Pentosane, $C_6H_{10}O_4$.

Polarisation; konstante Drehungen:

Rhamnose, $C_6H_{12}O_5 + H_2O$; $(\alpha)D = +8·3°$, anfänglich Minderdrehung.

---

[1]) *Adolf Jolles*, Über ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Pentosen. Sitzungsber. d. Wiener Akad. Bd. 114. IIb. S. 1191 (1905).

l-Fukose, $C_6H_{12}O_5$; $(\alpha)D = -75\cdot5^0$

d-Rhodeose, $C_6H_{12}O_5$; $(\alpha)D = +75\cdot5^0$.

Zur annähernden Bestimmung dieser aus den entsprechenden Methyl-Pentosanen hydrolytisch entstehenden Zuckerarten kann man den Umstand benutzen, daß sie mit Phenylhydrazin ziemlich schwerlösliche Hydrazone bilden, welche vor oder nach der Reinigung durch Umkristallisieren gewogen werden können.

Genauer werden sie durch Destillation mit Salzsäure von 1·06 spezifischem Gewicht, wobei sie Methyl-Furfurol liefern, bestimmt, indem dies mit Phlorogluzin als Methyl-Furfurol-Phlorogluzid niedergeschlagen wird (siehe den qualitativen Nachweis, S. 103).

Man verfährt genau so, wie es bei der Bestimmung der Pentosen angegeben ist. Sobald das Destillat mit Anilinacetat keine Gelbfärbung mehr zeigt, fällt man mit Phlorogluzin das rote Methyl-Furfurol-Phlorogluzid aus, filtriert, wäscht und trocknet es am folgenden Tage und rechnet es auf Methyl-Furfurol, auf Methyl-Pentose oder auf Methyl-Pentosan um.

Experimentell sind von *Ellett* und *Tollens* [1]) die Methylfurfurol-Phlorogluzidmengen, welche Rhamnose liefert, ermittelt worden, und dasselbe ist für Fukose von *W. Mayer* und *Tollens* [2]) geschehen, und die Resultate sind in Formeln und Tabellen niedergelegt worden. [3])

δ) Gemenge von Pentosen und Methyl-Pentosen.

Da in der Natur sehr häufig die genannten Substanzen als Pentosan und Methylpentosan zusammen vorkommen, erhält man, wie bei den qualitativen Proben angegeben ist, beim Destillieren von solchen Naturprodukten Furfurol und Methylfurfurol, und es sind, wenn man mit Phlorogluzin fällt, im Niederschlage beide Phlorogluzide gemengt.

Um sie auseinander zu bringen, erwärmen *Ellett, W. Mayer* und *Tollens* sie, nach vorheriger Trocknung und Wägung, mit Alkohol von 95⁰ Tr., welcher nur das Methylfurfurol-Phlorogluzid auflöst.

Die Auflösung des Methylfurfurol-Phlorogluzids bewirkt man, indem man den Goochtiegel mit den „gemengten Phlorogluziden" in einem Bechergläschen mit starkem Alkohol bis fast zum Kochen erhitzt, die braune

[1]) *W. B. Ellett* und *B. Tollens*, Über die Bestimmung der Methylpentosane neben den Pentosanen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **38**. S. 492 (1905); Über die Bestimmung der Methylpentosane neben den Pentosanen. Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerindustrie. Jg. **1905**. Technischer Teil. S. 19.

[2]) *Willy Mayer* und *B. Tollens*, Journ. f. Landwirtsch. Jg. **1907**. S. 261, 269; Über die Bestimmung der Methylpentosane und über die Fukose. Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerindustrie. Jg. **1907**. Technischer Teil. S. 620; Über die quantitative Bestimmung der Fukose und der Methylpentosane. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 2441 (1907).

[3]) Siehe *Willy Mayer* und *B. Tollens*, Über die Fukose und die Bestimmung der Methylpentosane. Journ. f. Landwirtsch. Jg. **1907**. S. 268, 269.

1 Methyl-Phlorogluzid	2 Fukose Gramm	3 Fukosan (Kol. 2 × 0·89	4 Rhamnose nach *Ellett* und *Tollens*	5 Rhamnosan (Kol. 4 × 0·8)	6 Methyl-Pentosan (Mittel v. Kol. 3 u. 5)
0·010	0·0260	0·0231	0·0266	0·0213	0·0222
0·011	0·0284	0·0253	0·0279	0·0223	0·0238
0·012	0·0307	0·0274	0·0295	0·0236	0·0255
0·013	0·0331	0·0295	0·0311	0·0249	0·0272
0·014	0·0354	0·0315	0·0327	0·0262	0·0288
0·015	0·0377	0·0336	0·0343	0·0274	0·0305
0·016	0·0400	0·0356	0·0359	0·0287	0·0321
0·017	0·0423	0·0376	0·0375	0·0300	0·0338
0·018	0·0445	0·0396	0·0391	0·0313	0·0354
0·019	0·0467	0·0416	0·0407	0·0326	0·0371
0·020	0·0489	0·0435	0·0423	0·0338	0·0386
0·021	0·0510	0·0454	0·0438	0·0350	0·0402
0·022	0·0532	0·0473	0·0454	0·0363	0·0418
0·023	0·0553	0·0492	0·0469	0·0375	0·0433
0·024	0·0574	0·0511	0·0485	0·0388	0·0449
0·025	0·0594	0·0529	0·0500	0·0400	0·0462
0·026	0·0614	0·0547	0·0516	0·0413	0·0480
0·027	0·0634	0·0565	0·0531	0·0425	0·0495
0·028	0·0654	0·0583	0·0547	0·0438	0·0510
0·029	0·0674	0·0600	0·0562	0·0450	0·0525
0·030	0·0693	0·0617	0·0578	0·0462	0·0539
0·031	0·0712	0·0634	0·0593	0·0474	0·0554
0·032	0·0731	0·0651	0·0609	0·0487	0·0569
0·033	0·0750	0·0668	0·0624	0·0499	0·0584
0·034	0·0768	0·0684	0·0639	0·0511	0·0598
0·035	0·0786	0·0700	0·0655	0·0524	0·0612
0·036	0·0804	0·0716	0·0670	0·0536	0·0626
0·037	0·0822	0·0732	0·0685	0·0548	0·0640
0·038	0·0839	0·0747	0·0700	0·0560	0·0654
0·039	0·0857	0·0764	0·0716	0·0573	0·0668
0·040	0·0874	0·0778	0·0731	0·0585	0·0681
0·041	0·0890	0·0792	0·0747	0·0598	0·0695
0·042	0·0907	0·0807	0·0761	0·0609	0·0708
0·043	0·0923	0·0821	0·0775	0·0620	0·0721
0·044	0·0939	0·0836	0·0790	0·0632	0·0734
0·045	0·0954	0·0850	0·0803	0·0644	0·0747
0·046	0·0970	0·0863	0·0820	0·0656	0·0759
0·047	0·0985	0·0877	0·0835	0·0668	0·0772
0·048	0·1000	0·0890	0·0849	0·0679	0·0785
0·049	0·1015	0·0903	0·0864	0·0691	0·0797
0·050	0·1029	0·0916	0·0879	0·0703	0·0809

Lösung absaugt und dies Extrahieren mit Alkohol zweimal wiederholt. Dann trocknet man den Tiegel mit dem zurückgebliebenen Furfurol-Phlorogluzide 2 Stunden lang im Wassertrockenschrank, wägt im Filterwägeglase usw.

Die Differenz gegen das ursprüngliche Gewicht der „gemengten Phlorogluzide" entspricht dem Methyl-Furfurol-Phlorogluzid.

Der Phlorogluzidrest oder das Furfurol-Phlorogluzid wird dann nach *Kröbers* Tabelle auf Pentosan und das Methylfurfurol-Phlorogluzid wird nach der Tabelle auf S. 137 von *W. Mayer* und *Tollens* auf Methyl-Pentosan umgerechnet.

Hier hat sich gezeigt, daß, ebenso wie Arabinose und Xylose etwas verschiedene Mengen Furfurol-Phlorogluzid liefern, auch Rhamnose und Fukose etwas verschiedene Mengen Methyl-Furfurolphlorogluzid geben, und auch hier ist deshalb eine Tabelle der Mittelwerte für Methylpentosen (Kol. 6 der Tabelle auf S. 137) gegeben worden, welche man anwendet, wenn man, wie in den meisten Fällen, nicht weiß, ob aus dem untersuchten Material Rhamnose oder Fukose (oder Rhodeose, welche voraussichtlich dieselben Zahlen wie Fukose liefern wird) hydrolytisch entstehen.

Wie bei der Furfurolbestimmung statt mit Phlorogluzin die Fällung mit Barbitursäure ausgeführt werden kann, so kann nach *Fromherz*[1]) auch das Methyl-Furfurol mit Barbitursäure gefällt werden. Der gelbe kristallinische Niederschlag, $C_{10}H_8N_2O_4$, wird in Goochtiegeln gesammelt, gewaschen, 5 Stunden im Dampftrockenschrank getrocknet und unter Berücksichtigung des Gelöstbleibens von 2·29 *mg* in je 100 cm^3 12%iger Salzsäure, auf Methyl-Furfurol durch Division durch 2 umgerechnet.

Methylpentosen kann man nach *Jolles*[2]) auf gleiche Weise wie die Pentosen bestimmen, denn sie liefern, bei der beschriebenen Art zu arbeiten, die theoretische Menge Methylfurfurol, und dies verhält sich dem Natriumbisulfit gegenüber analog dem Furfurol.

Wenn Pentosen und Methylpentosen gleichzeitig vorhanden sind, rät *Jolles*, die betreffende Flüssigkeit mit Barytlösung und viel starkem Alkohol zu versetzen und bei 0° 1½—2 Stunden stehen zu lassen, hierdurch wird die Arabinose als Barytverbindung gefällt. Man wäscht den Niederschlag mit Alkohol aus, destilliert ihn mit Salzsäure, wie es oben beschrieben ist.

Wenn man zuerst das Gemenge von Arabinose und Methylpentose (Rhamnose) und dann die wie oben gefällte Arabinose mit Salzsäure destilliert und die für Pentose und Methylpentose erforderliche Jodlösung bestimmt hat, so gibt die Differenz zwischen den Zahlen der beiden

---

[1]) *Konrad Fromherz*, Dissertation. S. 33. Straßburg 1906; Zur quantitativen Bestimmung des Methylfurols. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50. S. 241 (1906/1907).

[2]) *Adolf Jolles*, Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Methylpentosen. Ann. Chem. Vol. 351. p. 41 (1907).

Destillationen die der Rhamnose zukommende Menge, und hieraus berechnet man die Methylpentoseprozente (siehe die Bemerkung am Schlusse der Pentosen, S. 135).

ε) Glukuronsäure, $C_6H_{10}O_7$.

Glukuronsäurelakton oder Glukuron, $C_6H_8O_6$, und gepaarte Verbindungen der Glukuronsäure mit anderen Stoffen, Euxanthinsäure etc.

a) Furfurol-Destillationsmethode.

Wie die Pentosen liefert (siehe qualitative Reaktion) auch Glukuronsäure — sei sie frei als Lakton, sei sie als gepaarte Verbindung vorhanden — beim Destillieren mit Salzsäure Furfurol und daneben 1 Mol. Kohlensäure, und man kann sie nach *Lefèvre* und *Tollens*[1]) einerseits durch Wägung des Furfurol-Phlorogluzids und andrerseits durch Wägung der entstandenen Kohlensäure bestimmen.

Die Bestimmung des Furfurol-Phlorogluzids geschieht genau wie bei den Pentosen, nur muß das erhaltene Furfurol-Phlorogluzid anders auf Glukuronsäure umgerechnet werden.

Da *Lefèvre* und *Tollens* gefunden haben, daß das Glukuronsäurelakton fast genau $^1/_3$ seines Gewichtes an Furfurol-Phlorogluzid liefert, multipliziert man das Phlorogluzid mit 3 und erhält auf diese Weise die Milligramm Glukuron, welche in der angewandten Substanz vorhanden sind, und zwar sowohl im freien Glukuron als auch in Euxanthinsäure, Piuri, Urochloralsäure usw.

Natürlich versagt diese Methode, wenn, wie es in Harn, Organen usw. der Fall sein kann, neben Glukuronsäure auch Pentosen vorhanden sein können, weil man nicht wissen kann, aus welchen der genannten Substanzen das Furfurol stammt.

b) Kohlensäure-Abspaltungsmethode.

Für diese Fälle haben *Lefèvre* und *Tollens* die zweite Methode, d. h. die Kohlensäure-Abspaltungsmethode, ausgearbeitet.

Hierzu kocht man das Material mit 100 cm^3 Salzsäure von 1·06 spez. Gew. in der Kochflasche des Furfurol-Destillationsapparates, *a* (siehe Fig. 10). Man läßt jedoch keine kondensierbaren Dämpfe übergehen und erreicht dies durch Anbringung eines Rückflußkühlers, *b*, auf der Kochflasche. So fließen Furfurol und Salzsäure zurück, und nur die Kohlensäure entweicht. Die CO_2 wird durch Röhrchen mit Wasser, *c*, dann, zum

[1]) *K. U. Lefèvre* und *B. Tollens*, Untersuchungen über die Glukuronsäure, ihre quantitative Bestimmung und ihre Farbenreaktionen. Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zucker-Industrie. Jg. **1907**. S. 1097; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 4513 (1907); siehe auch *A. Günther, G. de Chalmot* und *B. Tollens*, Über die Bildung von Furfurol aus Glykuronsäure und deren Derivaten, sowie aus Eiweißstoffen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **25**. S. 2569 (1892); *F. Mann* und *B. Tollens*, Über die Bildung von Furfurol und Kohlensäure aus Glukuronsäure. Ann. Chem. Vol. **290**. p. 157 (1896); *B. Tollens*, Zur Bestimmung der Glukuronsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44**. S. 388 (1905).

Trocknen, durch ein Chlorcalciumrohr, *d*, geleitet und tritt schließlich in einen gewogenen Kaliapparat, *e*. Um alle CO_2 in den letzteren überzuführen, leitet man während der ganzen, 3½ Stunden dauernden, Zeit einen langsamen Strom gereinigter Luft durch den Apparat, indem ein einfacher Aspirator, *g*, an den Kaliapparat angeschlossen ist, er saugt die Luft heraus, und zum Ersatz derselben tritt in die Entwicklungskochflasche mittelst einer den Kautschukstopfen passierenden Röhre Luft, welche vorher durch eine wirksame Waschflasche, *h*, mit Kalilauge geleitet ist. *f* ist ein Chlorcalciumrohr.

Zahlreiche Versuche haben gezeigt, daß Glukuronsäurelakton, der Theorie entsprechend, 25% seines Gewichtes an CO_2 entwickelt, und man multipliziert folglich die Gewichtsvermehrung des Kaliapparates mit 4.

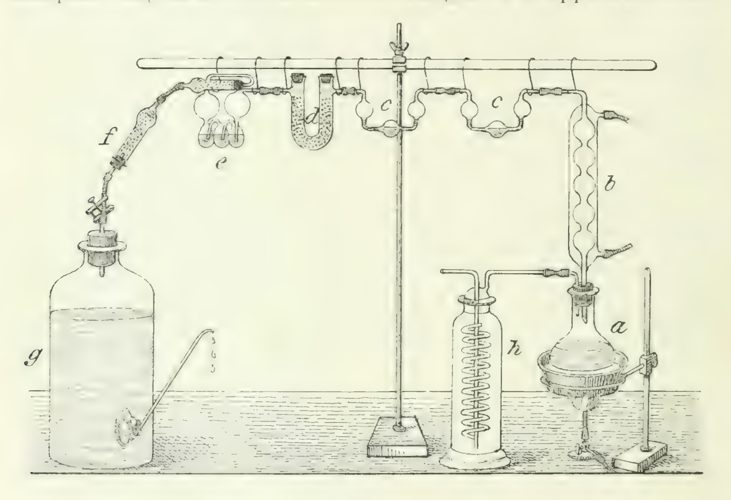


Fig. 10.

Wenn man mit den oben genannten Gemengen von Pentosen (oder Pentosanen) und Glukuronsäure (oder deren Derivaten) zu tun hat, bestimmt man durch Furfurol-Salzsäuredestillation das Gewicht des zu erhaltenden Furfurol-Phlorogluzids. Darauf bestimmt man durch Kochen mit Salzsäure im soeben beschriebenen Apparate die entweichende Kohlensäure, welche nur von dem Glukuron herrührt. Multiplikation mit 4 gibt das Glukuron, und Division durch 3 das ihm entsprechende Furfurol-Phlorogluzid, also $CO_2 \times \frac{4}{3}$ = Phlorogluzid aus Glukuron.

Jetzt zieht man das so ermittelte Phlorogluzid von dem wie oben erhaltenen Furfurol-Phlorogluzid aus Pentose + Glukuron ab und erhält als Differenz das von den Pentosen gelieferte Phlorogluzid, und aus diesem mittelst *Kröbers* Tabelle die Pentosen.

Die Anwendung der CO_2-Methode auf Harn ist noch nicht geprüft worden.

Vielleicht kann auch die Methode *Neubergs*[1]) der Fällung der Glukuronsäure mittelst p-Bromphenylhydrazin zur annähernd quantitativen Bestimmung dienen. Auch die Naphtoresorzin-Reaktion der Glukuronsäure führt nach persönlicher Mitteilung von *C. Tollens* zur annähernden Bestimmung.

2. Hexosen, $C_6 H_{12} O_6$.

α) d-Glukose, Dextrose, Traubenzucker, Harnzucker.

Meistens benutzt man die Methode der alkalischen Metallsalzlösungen (siehe diese in einem anderen Abschnitt des Handbuchs) und der Polarisation (siehe unten).

Annähernd kann man die Glukose — sei sie frei, sei sie als Glukosegruppen, wie in Stärke, Glukosiden usw. vorhanden — bestimmen, indem man sie durch Oxydation mit Salpetersäure in Zuckersäure verwandelt und diese als Monokaliumsalz wägt (siehe qualitative Bestimmungen).

5 *g* Glukose oder auch Stärke geben meistens gegen 1·5—2 *g* $C_6 H_9 O_8 K$, doch sind die Resultate recht wechselnd.

Auch aus der bei *E. Fischers* **Osazonprobe** mit Phenylhydrazin sich abscheidenden Menge Glykosazon kann man nach *Maquenne*[2]) und nach *Lintner* und *Kröber*[3]) auf die vorhandene Menge Glukose schließen, denn 1 *g* Glukose gibt z. B. nach *E. Fischer* beim $1^1/_2$stündigen Erhitzen mit 2 *g* salzsaurem Phenylhydrazin, 3 *g* Natriumacetat und 20 *g* Wasser 0·85—0·95 *g* Glykosazon und *Lintner* und *Kröber* sowie *Maquenne* geben ebenfalls Zahlen an. Übrigens werden die Resultate bei gemengten Flüssigkeiten, wie z. B. Harn, nur höchst annähernd sein.

(Fruktose gibt bei der gleichen Art der Versuchsanstellung stets mehr an Osazon als Glukose.)

Man kann die Glukose auch durch **Gärung** bestimmen, denn sie zerfällt, mit Hefe in Berührung, in Alkohol und Kohlensäure:

$$\underset{\text{Glukose}}{C_6 H_{12} O_6} = 2\,\underset{\text{Alkohol.}}{C_2 H_6 O} + 2\, CO_2$$

Das Kohlendioxyd läßt sich durch Aufsaugen in einem Kaliapparat oder einem Natronkalkrohr und Gewichtsvermehrung dieser Apparate bestimmen (siehe besonders *Jodlbauer*[4]).

[1]) *Carl Neuberg*, Über eine Verbindung der Glukuronsäure mit p-Bromphenylhydrazin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 2395 (1899); *P. Mayer* und *C. Neuberg*, Über den Nachweis gepaarter Glukuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 261 (1900).

[2]) *Maquenne*, Sur l'emploi de la phénylhydracine à la détermination des sucres. Comptes rendus. T. **112**. p. 799 (1891).

[3]) *C. J. Lintner* und *E. Kröber*, Über die Verwendung des Glukosazons zur quantitativen Bestimmung von Dextrose, Lävulose und Saccharose. Chemiker-Zeitung. Bd. **19**. Rep. S. 142 (1895); das. nach Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen. Bd. 18. S. 153 (1895).

[4]) *Max Jodlbauer*, Über die Anwendbarkeit der alkoholischen Gärung zur Zuckerbestimmung. Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. 1888. S. 308, 313, 346.

Dies ist zwar, wenn man alle für Gasoperationen erforderlichen Bedingungen beobachtet, genau, doch ist es nicht sehr einfach. Nach *Jodlbauer* liefert Glukose 46·54% CO_2 und Rohrzucker 49·04% CO_2.

Volumetrisch kann man ebenfalls die CO_2 bestimmen, indem man sie in Röhren über Quecksilber, etwa in einer *Bunte*schen oder *Winkler*schen Gasbürette auffängt, ihr Volum unter Berücksichtigung von Druck und Temperatur abliest und es auf Gewicht umrechnet. Man muß bedenken, daß immer etwas der aus dem Zucker entstandenen Kohlensäure in der Gärflüssigkeit adsorbiert bleibt.

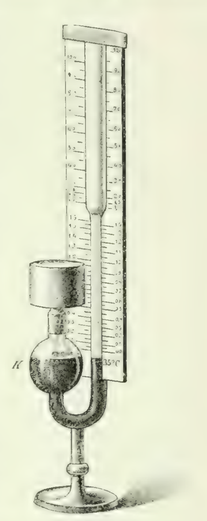


Fig. 11.

Hat man die Kohlensäure in Kubikzentimetern ermittelt, so bedenkt man, daß 1 *cm*³ CO_2 (bei 0° und 760 *mm* Druck) 1·96 *mg* wiegt und zirka 4 *mg* Glukose entspricht.

Annähernd genau läßt sich die Auffangung und Messung des Kohlendioxyds mittelst der sogenannten Gärungsapparate oder Gärröhren bestimmen.

Einfach sind diejenigen von *Einhorn* und von *Fiebig;* bei diesen wird das Kohlendioxyd über der Flüssigkeit, aus welcher sie sich entwickelt hat, gemessen, bei dem Apparat von *Weidenkaff* [1]) wird Quecksilber zur Absperrung verwandt.

Häufig wird der Apparat von *Lohnstein* [2]) angewandt und es möge dessen abgekürzte Gebrauchsanweisung hier folgen (siehe Fig. 11).

Vor dem Gebrauche nimmt man den Stöpsel der Glaskugel, *K*, ab und hängt die zweiteilige Skala oben auf das senkrechte Rohr. Man gießt dann Quecksilber ein, so daß seine Oberfläche möglichst gleich hoch wie der Nullpunkt der Skalen steht. Dann bringt man von einer Mischung von 2 *g* Preßhefe mit 6 *cm*³ Wasser, welche man mit einem Mörser bereitet hat, 0·1—0·2 *cm*³ in die Glaskugel, ferner 0·5 *cm*³ des Harns. Man setzt dann den gut eingefetteten Stöpsel in die Öffnung der Kugel und dreht ihn so, daß ein in ihm befindliches kleines Loch auf ein ebensolches Loch im Halse der Kugel paßt. Hierdurch wird ein Druck in der Kugel vermieden. Nun dreht man den Stöpsel so, daß die Löcher nicht mehr aufeinander passen und erreicht hierdurch völligen Verschluß. Man setzt das beigegebene Gewicht auf die Kugel und überläßt (nach Abnahme der Skala) den Apparat sich selbst, und zwar entweder bei Zimmertemperatur oder bei erhöhter

---

[1]) *E. Weidenkaff*, Gärungssaccharometer mit Quecksilberfang. Chem.-Ztg. Jg. **1908**. S. 316.

[2]) *Theodor Lohnstein*, Über Gärungssaccharometer nebst Beschreibung eines neuen Gärungssaccharometers für unverdünnte Urine. Münchener med. Wochenschr. Jg. **1899**. Nr. 50; siehe auch Anleitung zum chemischen Arbeiten für Mediziner von Dr. *F. Röhmann*. 2. Aufl. Berlin 1904. S. 33.

Temperatur. Am folgenden Tage ist die Gärung vollendet, das Quecksilber ist dann mehr oder weniger durch die entwickelte Kohlensäure in das aufrechte Rohr getrieben. Man liest den Quecksilberstand an der wieder übergehängten Skala ab und findet hier direkt Prozente an Zucker angegeben.

Statt daß man aus der entwickelten Kohlensäure den Zucker berechnet, kann man ihn auch finden, indem man vor der Gärung und nach der Gärung das spezifische Gewicht der Flüssigkeit bestimmt, wobei die sich zeigende Differenz ein Maß für die vergorene Glukose ist, oder aber man bestimmt den gebildeten Alkohol durch Destillation und Ermittlung des spezifischen Gewichtes des Destillates.

Weiter existieren kolorimetrische Bestimmungsmethoden sowie sonstige Methoden, welche auf die Bestimmung des Lichtbrechungsvermögens der zuckerhaltigen Flüssigkeit gegründet sind. Hierüber sehe man im Buche von *v. Lippmann*, z. B. S. 577, nach.

Wichtig ist die **Polarisationsmethode.**

(α) D der wasserfreien Glukose ist =

$$= + 52{\cdot}5^0 + 0{\cdot}018796\,P + 0{\cdot}000517\,P^2,$$

worin P den Prozentgehalt der Lösung bedeutet: die spezifische Drehung steigt also etwas mit der Konzentration, und sie ist für $10^0/_0$ige Lösung $+ 52{\cdot}7^0$.

Über die Manipulationen der Polarisation reiner Glukose siehe S. 125—127.

Bei Anwendung der 200 *mm* langen Beobachtungsröhre ist für je 1 Grad der Ablesung in den Kreisgradapparaten mit meist genügender Genauigkeit 0·952 *g* Glukose in 100 cm^3 der polarisierten Flüssigkeit zu rechnen (nach *Königs* Handbuch, S. 234, sind 0·9434 *g* anzunehmen).

Für je 1 Skalenteil der Ablesung in dem Quarzkeilapparate mit *Ventzke*scher Zuckerskala sind 0·3268 *g* Glukose in 100 cm^3 zu rechnen.

Wendet man das 100 *mm*-Rohr an, so sind die obigen Zahlen natürlich zu verdoppeln.

Wie früher bemerkt, sind an manchen Apparaten die Skalen so eingerichtet, daß sie direkt Gramm Glukose in 100 cm^3 angeben, d. h. sogenannte „Volumprozente", welche, durch das spezifische Gewicht der Flüssigkeit dividiert, wirkliche Gewichtsprozente geben. Es sind dies meistens die zu ärztlichem Gebrauch bestimmten Instrumente.

Um die zur Polarisation unerläßliche Klarheit der Flüssigkeit zu erlangen, versetzt man 100 cm^3 des Harns mit einigen Kubikzentimetern Bleiessig, filtriert, polarisiert und zieht die Volumvermehrung durch den Bleiessigzusatz in Rechnung (s. S. 127).

Wenn Eiweiß vorhanden ist, kann man dies vorher durch Erhitzen des Harns mit etwas Salpetersäure oder Essigsäure ausfällen: übrigens wird es durch den Bleiessig entfernt.

Man darf nicht mehr Bleiessig anwenden, als zur Fällung der Beimengungen erforderlich ist, denn bei erheblichem Überschuß des Bleiessigs

und besonders, wenn die Reaktion der Flüssigkeit alkalisch ist, kann bedeutende Änderung der spezifischen Drehung des Zuckers eintreten, den neuerdings besonders *Grössmann* [1]) nachgewiesen hat.

Wenn im Harn als Zucker nur Glukose vorhanden ist, stimmen bei sachgemäßer Ausführung die durch *Fehling*sche Lösung und durch Polarisation ermittelten Zahlen zusammen. Wenn das letztere nicht stattfindet, wenn die Polarisation weniger Zucker angibt als *Fehling*sche Lösung, ist dies ein Anzeichen, daß andere Zuckerarten (besonders Fruktose [2]) oder vielleicht Glukuronsäurederivate vorhanden sein werden.

Sollte die Polarisation einmal höhere Zahlen als die Kupferbestimmung geben, so wäre Maltose oder vielleicht ein (künstlicher) Zusatz von Rohrzucker zum Harn zu vermuten.

β) Fruktose, Lävulose, Fruchtzucker.

Auch diese Hexose (welche zu den Ketosen gehört) läßt sich mit *Fehling*scher Lösung und durch Polarisation bestimmen.

Sie dreht im Gegensatz zu Glukose, Galaktose, Rohrzucker und Maltose stark nach links, und diese Drehung verändert sich im Gegensatz zu derjenigen der meisten anderen Zuckerarten stark mit der Temperatur, indem sie beim Abkühlen steigt und beim Erwärmen von 20° auf 90° C auf ungefähr die Hälfte sinkt.

Nach *Ost* [3]) ist bei 20° $(\alpha)D = -(91{\cdot}9^\circ + 0{\cdot}111\,p)$, worin p die Prozente Fruktose in der Lösung bezeichnet. In 10%iger Lösung ist hiernach $(\alpha)D = -93^\circ$.

Nach *Jungfleisch* und *Grimbert* [4]) ist $(\alpha)D = -101{\cdot}38^\circ + 0{\cdot}56\,t - 0{\cdot}108\,(p - 10)$, worin t die Temperatur und p der Prozentgehalt der Lösung ist, hiernach ist die Drehung bei 20° C und in 10%iger Lösung $= -90{\cdot}18^\circ$.

Annähernd wird man Fruktose durch Fällung mit Kalk, Zersetzung des Niederschlages mit Oxalsäure und Polarisieren, oder aber nach *Neuberg* [5]) durch Fällung mit Methyl-Phenylhydrazin bestimmen können.

In betreff der Kalkmethode mag auf die Darstellungsmethoden der Fruktose verwiesen werden (siehe S. 76).

Die Methyl-Phenylhydrazinmethode gründet sich darauf, daß Fruktose bei Gegenwart von Essigsäure beim gelinden Erwärmen ein

[1]) *H. Grossmann*, Über die Bedeutung von Bleisalzen für die polarimetrische Untersuchung des Harnes und der Gewebssäfte. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 338 (1906).

[2]) Siehe besonders *Rosin*, Beitr. zur wissenschaftl. Med. u. Chemie. *Salkowski*-Festschrift. Berlin 1904. S. 105.

[3]) *H. Ost*, Drehungsvermögen der Lävulose und des Invertzuckers. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **24**. S. 1636 (1891).

[4]) *E. Jungfleisch* und *L. Grimbert*, Sur la lévulose. Compt. rend. T. **107**. p. 390; Sur le sucre inverti. Ebenda. T. **108**. p. 144.

[5]) *Carl Neuberg*, Über die Isolierung von Ketosen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 960 (1902).

schwer lösliches Methyl-Phenyl-Osazon, $C_6H_{10}O_4 \cdot \left(N_2 \begin{matrix} C_6H_5 \\ CH_3 \end{matrix}\right)_2$, liefert und daß andere Glykosen dies nicht tun sollen (siehe S. 111).

Man bringt die ziemlich konzentrierte Lösung (ca. 10—11 *cm*³) mit etwas mehr als der berechneten Menge Methyl-Phenylhydrazin, soviel Alkohol, wie zur Gewinnung einer klaren Lösung erforderlich ist, und 4 *cm*³ einer 50%igen Essigsäure 5—10 Minuten aufs Wasserbad. Am folgenden Tage hat sich das Osazon in gelbroten Nadeln abgeschieden.

In reinem Zustande schmilzt es bei 158—160° und dreht es (in Alkohol und Pyridin gelöst) rechts.

Sind andere Zuckerarten zugegen, so läßt man die mit Methyl-Phenylhydrazin, aber nicht mit Essigsäure, versetzte Flüssigkeit erst 24 Stunden stehen, saugt das etwa ausgeschiedene Mannose- oder Galaktose-Methyl-Phenylhydrazin ab und versetzt dann mit Essigsäure, worauf das Methyl-Phenyl-Osazon beim Erhitzen ausfällt und am folgenden Tage abfiltriert wird.

γ) **Glukose und Fruktose** (besonders **Invertzucker**).

Sehr häufig findet sich Fruktose neben Glukose in der Natur, z. B. in süßen Früchten, und ferner ist sie der neben Glukose aus Rohrzucker durch Hydrolyse oder Inversion mittelst Säuren oder Fermenttätigkeit entstehende Zucker, welcher mit Glukose zusammen den sog. „Invertzucker" bildet.

Wenn sich Fruktose neben Glukose findet, kann man sie nach *Sieben*[1]) bestimmen, indem man zuerst mittelst *Fehling*scher Lösung beide Glykosen bestimmt, dann eine andere Menge der Flüssigkeit mit Salzsäure von bestimmtem Gehalt 3 Stunden auf dem kochenden Wasserbade erhitzt, wodurch die Fruktose zerstört wird, nach dem Erkalten neutralisiert und darauf die nicht (oder wenig) zerstörte Glukose bestimmt. Die Differenz ist die Fruktose. Das Verfahren gibt nach *Herzfeld, Wichmann, Dammmüller*[2]) nicht immer ganz gute Resultate, doch sind die letzteren stets annähernd gewesen.

Einigermaßen genaue Resultate gibt die Kombination der Resultate der Zuckerbestimmung mittelst *Fehling*scher Lösung und der Polarisation.

Da Glukose und Fruktose sich nicht ganz gleich gegenüber der *Fehling*schen Lösung verhalten, muß man freilich beim Umrechnen der durch Titrieren oder Bestimmung des reduzierten Kupfers gewonnenen Zahlen auf Glykosen intermediäre Zahlen anwenden, und dies sowie der Umstand, daß die spezifische Drehung von Glukose und Fruktose je

---

[1]) *Ernst Sieben*, Über die Zusammensetzung des Stärkesirups, des Honigs und über die Verfälschungen des letzteren. Zeitschr. d. Ver. f. d. d. Zuckerindustrie. Jg. 1884. S. 837, 865.

[2]) *v. Lippmann*, Zuckerarten. S. 895.

nach der Konzentration etwas wechselnd ist, macht die Methode etwas ungenau, wenn man nicht nach annähernd ermittelter Konzentration der Glykosen genauere Zahlen einsetzt, was die Methode umständlich macht.

Als annähernde Polarisationszahlen kann man folgende annehmen: Bei 20° C und bei Anwendung des 200 *mm*-Rohres ist

$$-1^{\circ}\ \text{Kreisdrehung} = \frac{100}{92{\cdot}5\ .\ 2} = 0{\cdot}538\ g\ \text{Fruktose in } 100\ cm^3$$

$$+1^{\circ}\ \text{Kreisdrehung} = \frac{100}{52{\cdot}5\ .\ 2} = 0{\cdot}952\ g\ \text{Glukose in } 100\ cm^3.$$

Gesetzt, es seien durch Bestimmung mit *Fehling*scher Lösung in einem Fruchtsaft oder dergl. a Gramm Glykosen in 100 cm^3 und ferner b Grad Linksdrehung (—) oder Rechtsdrehung (+) gefunden und sei x die Glukose und a—x die Fruktose, so setzt man an

$$b = \frac{x}{0{\cdot}952} - \frac{a-x}{0{\cdot}538};$$

hieraus erhält man:

$$b\ .\ 0{\cdot}952\ .\ 0{\cdot}538 = 0{\cdot}538\,x - 0{\cdot}952\,a + 0{\cdot}952\,x$$

$$0{\cdot}5122\ b = 1{\cdot}490\,x - 0{\cdot}952\,a$$

$$0{\cdot}5122\ b + 0{\cdot}952\,a = 1{\cdot}49\,x$$

$$\frac{0{\cdot}5122\ b + 0{\cdot}952\,a}{1{\cdot}49} = x = \text{Glukose}$$

$$a - x = \text{Fruktose.}$$

Beide als Gramm in 100 cm^3.

Dreht z. B. eine Lösung, in welcher man 15 *g* Glykose auf 100 cm^3 gefunden hat, im 200 *mm*-Rohr 5° nach links, so hat man

$$x = \frac{0{\cdot}5122 \cdot -5 + 0{\cdot}952 \cdot 15}{1{\cdot}49} = 7{\cdot}86\ g\ \text{Glukose und } y = 15 - 7{\cdot}86 =$$

$= 7{\cdot}14\ g$ Fruktose.

Hierbei haben die 7·86 *g* Glukose nach $\frac{7{\cdot}86}{0{\cdot}952} = 8{\cdot}26^{\circ}$ Rechtsdrehung und die 7·14 *g* Fruktose nach $\frac{7{\cdot}14}{0{\cdot}538} = 13{\cdot}27^{\circ}$ Linksdrehung veranlaßt, und $+8{\cdot}26^{\circ} - 13{\cdot}27^{\circ} = -5{\cdot}01^{\circ}$, d. h. 5° Linksdrehung.

Hat man mit dem gewöhnlichen Quarzkeilapparat gearbeitet, so multipliziert man vor der obigen Rechnung die Skalenteile mit 0·346, um die Drehung in Kreisgraden zu erhalten.

Je nachdem man (α)D der Glykosen etwas höher oder niedriger nimmt, werden die Formeln etwas anders, und in der Tat finden sich in der Literatur verschiedene derartige Formeln. (Siehe z. B. *Neubauer* [1]), welcher zuerst diese Untersuchungen angestellt hat, ferner *Wichmann* u. a.)

[1]) *C. Neubauer*, Quantitative Bestimmung der Dextrose neben der Lävulose auf indirektem Wege. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **10.** S. 827 (1877).

Neuerdings hat *Geelmuyden*[1]) ähnliche Formeln zur Bestimmung von Glukose und Fruktose im Harn gegeben.

δ) **Mannose,** $C_6 H_{12} O_6$.

Man versetzt mit Phenylhydrazinacetat, saugt das am folgenden Tage abgeschiedene Mannose-Phenylhydrazon, $C_6 H_{12} O_5 . N_2 H . C_6 H_5$, ab, trocknet es nach dem Auswaschen, wägt es und berechnet auf $C_6 H_{12} O_6$, indem man $C_{12} H_{18} N_2 O_5 : C_6 H_{12} O_6$ rechnet, d. h. mit $^2/_3$ multipliziert.

ε) **Galaktose,** $C_6 H_{12} O_6$.

Man führt die S. 113 zur qualitativen Nachweisung der Galaktose angegebene Methode sorgfältig aus und wägt die Schleimsäure, welche man aus der abgewogenen Substanz mit dem 12fachen (in Kubikzentimetern) an Salpetersäure von 1·15 spez. Gew. durch Abdampfen auf $^1/_3$ des Volums, Zerrühren mit etwas kaltem Wasser, Abfiltrieren auf gewogenem Filter, Auswaschen, Trocknen erhalten hat.

Da nach *Kent*[2]), *Rischbiet*[3]) und *Tollens* Galaktose annähernd 75% ihres Gewichtes an Schleimsäure liefert, multipliziert man die letztere mit $^4/_3$, um das Gewicht der Galaktose zu erfahren. Die Methode ist von *E. Schulze* und *Steiger*[4]) angewandt worden, ferner von *R. Bauer*[5]) zur Untersuchung von Harn auf Galaktose und Milchzucker.

Man bedenke, daß mit Salpetersäure aus Milchzucker Schleimsäure entsteht, und zwar nur ca. 35%.

Natürlich ist auch die Polarisationsmethode brauchbar. 1 Kreisgrad Rechtsdrehung zeigt bei Verwendung des 200 *mm*-Rohres $\frac{100}{81 \; . \; 2} = 0·617$ g Galaktose in 100 *cm*³.

3. Di-Saccharide, $C_{12} H_{22} O_{11}$.

α) **Rohrzucker,** $C_{12} H_{22} O_{11}$.

Hat man mit reinen Rohrzuckerlösungen zu tun, so benutzt man neben der Polarisation (s. u.) die Ermittlung des spezifischen Gewichtes mittelst eines Pyknometers, z. B. des *Sprengel-Landolt*schen, oder eines Aräometers, und bedient sich der Tabellen, welche die dem spezifischen Gewicht entsprechenden Zuckerprozente angeben.

[1]) *H. Chr. Geelmuyden*, Entwurf einer Methode zur quantitativen Bestimmung mehrerer Zuckerarten nebeneinander in diabetischen Harnen. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 48. S. 137 (1909).

[2]) *W. H. Kent* und *B. Tollens*, Untersuchungen über Milchzucker und Galaktose. Ann. Chem. Vol. 227. p. 223 (1885).

[3]) *P. Rischbiet* und *B. Tollens*, Versuche mit Melasse- und Baumwoll-Raffinose. Ann. Chem. Vol. 232. p. 187 (1885).

[4]) *E. Schulze* und *E. Steiger*, Über das Vorkommen eines unlöslichen, Schleimsäure gebenden Kohlehydrats in Rotklee- und Luzernepflanzen. Landw. Vers.-Stat. Bd. 36. S. 11; Untersuchungen über die stickstofffreien Reservestoffe der Samen von Lupinus luteus und über die Umwandlungen derselben während des Keimungsprozesses, das. Bd. 36. S. 438, 465 (1899).

[5]) *Richard Bauer*, Eine expeditive Methode zum Nachweis von Galaktose und Milchzucker im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51. S. 159 (1906/1907).

Sie stimmen beinahe überein, und ihre Prozentanzeigen werden als Grade *Balling* und *Brix* bezeichnet.

Diese Tabellen, besonders diejenigen von *Brix*, zeigen die Beziehungen zwischen spezifischem Gewicht, Zuckerprozenten usw., und sie befinden sich in den Büchern von *Frühling* usw.

Bequemer sind die Aräometer, welche durch ihr Eintauchen direkt an ihrer Skala die Zuckerprozente anzeigen und Saccharometer genannt werden. Hier sind in Brauereien und Brennereien die Saccharometer von *Balling* und in Zuckerfabriken die Saccharometer von *Brix* in Gebrauch.

Sind die Zuckerlösungen nicht rein, so wirken die Beimengungen annähernd wie der Zucker auf das spezifische Gewicht, und folglich bezeichnen die Grade dann nicht Prozente an Zucker, sondern Prozente an Zucker + Beimengungen oder Prozente an Trockensubstanz.

Ferner ist zur Bestimmung des Gehaltes an Rohrzucker in Flüssigkeiten die Ermittlung des Brechungsexponenten mittelst des von Zeiss in Jena hergestellten Refraktometers nach *Abbe* neuerdings eingeführt worden. Siehe u. a. *Strohmer, Müller*, *Lange* und besonders *Main.*[1])

Es gibt dieses Instrument in ganz reinen Rohrzuckerlösungen nach den Tabellen der genannten Autoren den Prozentgehalt an Zucker an, in Lösungen, welche noch andere Substanzen enthalten, dagegen den Gehalt an Zucker und den Beimengungen, d. h. den Trockensubstanzgehalt. Es bewirkt also ungefähr dasselbe wie die Ermittlung des spezifischen Gewichts, die Bestimmungen sind aber bequem mit sehr kleinen Mengen auszuführen.

Den Rohrzucker allein bestimmt man auf andere Weise. Man kann den Rohrzucker der Rüben, wie es schon *Marggraf* im Jahre 1747 beschrieb, allenfalls durch Extrahieren mit starkem Alkohol, Verdunsten des Alkohols und Wägen der nach kürzerer oder längerer Zeit abgeschiedenen Kristalle annähernd bestimmen, doch versagt dieses Verfahren häufig, weil Beimengungen sehr leicht das Kristallisieren hindern.

Besser, wenn auch nicht strenge quantitativ, ist das Verfahren der Strontianfällung von *E. Schulze.*[2]) Man extrahiert die gewogene getrocknete Substanz mit starkem bis absolutem Alkohol, setzt der kochenden Extraktionsflüssigkeit nach und nach von einer heiß gesättigten Lösung von kristallisiertem Strontiumhydroxyd zu, bis ca. 3 Teile des letzteren auf 1 Teil Rohrzucker vorhanden sind, kocht $^1/_2$ Stunde lang im Wasserbade, saugt ab und wäscht mit Strontianlösung aus. Den Niederschlag bringt man in Wasser, sättigt mit Kohlensäuregas, saugt die Zuckerlösung vom Strontiankarbonat ab und sucht sie zur Kristallisation zu bringen.

[1]) *Hugh Main*, Schnelle Wasserbestimmung in Zuckerfabrikprodukten, wie Sirupen, Füllmassen etc. Zeitschr. d. Ver. f. d. deutsche Zuckerindustrie. Jg. **1907**. II. S. 1008.

[2]) *E. Schulze*, Über den Nachweis von Rohrzucker in vegetabilischen Substanzen. Landw. Vers.-Stat. Bd. **34**. S. 408 (1887); *E. Schulze* und *S. Frankfurt*, Über die Verbreitung des Rohrzuckers in den Pflanzen, über seine physiologische Rolle und über lösliche Kohlenhydrate, die ihn begleiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 511 (1895); *E. Schulze*, Über den Nachweis von Rohrzucker in vegetabilischen Substanzen. Bd. **27**. S. 267 (1899); Zum Nachweis des Rohrzuckers in Pflanzensamen. Bd. **52**. S. 405 (1907).

Gelingt dies nicht oder nicht genügend, so sucht man es durch Zerreiben des Sirups mit absolutem Alkohol, durch Lösen in heißem starken Alkohol, durch neues Ausfällen mit Strontiumhydroxyd usw. zu erreichen.

Schließlich bringt man die Kristalle auf Ton und polarisiert; es ist jedoch klar, daß bei den beschriebenen Methoden viel Zucker verloren gehen kann.

Rohrzucker-Polarisation.

Wichtiger als die obigen mehr für die qualitativen Bestimmungen geeigneten Methoden ist die Bestimmung durch Polarisation, ja, es ist die fast einzig angewandte.

$(\alpha) D$ des Rohrzuckers ist nach *Tollens* für 4—18%ige Lösungen $= + 66{\cdot}81 - 0{\cdot}0155\,p - 0{\cdot}00005\,p^2$ und für 18—60%ige Lösungen $= + 66{\cdot}386 + 0{\cdot}0150\,p - 0{\cdot}00040\,p^2$, und nach *Schmitz* ist $(\alpha) D = + 66{\cdot}51 + 0{\cdot}0045\,p - 0{\cdot}00028\,p^2$; folglich nimmt die Drehung mit zunehmender Konzentration etwas ab. Für annähernd 10%ige Lösungen kann man $(\alpha) D = + 66{\cdot}5^0$ annehmen, und hieraus folgt, daß im 200 *mm*-Rohr 1 Kreisgrad nach rechts einer Drehung von $\frac{100}{66{\cdot}5\,.\,2} = 0{\cdot}752$ *g* Rohrzucker in 100 cm^3 der Lösung entspricht.

Wenn man den gewöhnlichen Quarzkeil-Halbschattenapparat benutzt, so erinnert man sich des Umstandes, daß die Skala desselben so eingerichtet ist, daß im 200 *mm*-Rohr eine Lösung von 26·048 *g* (dem sogenannten „Normalgewicht") reinen Rohrzuckers in Wasser zu 100 cm^3 von gewöhnlicher Temperatur genau 100 Skalenteile Verschiebung bewirkt. Folglich entspricht ein Skalenteil einem Gehalt von 0·26048 *g* Zucker in 100 cm^3 (s. S. 125).

(Falls man nicht nach *Mohrs* Vorgange bei 17·5° C geaichte, sondern bei 4° C geaichte Maßkolben, d. h. sogenannte „wahre 100 cm^3-Kolben" verwendet, so ist das „Normalgewicht" 26 *g*, und 1 Skalenteil zeigt 0·26 *g* Zucker in 100 cm^3 an.)

Um eine Polarisation, z. B. von Rübensaft, auszuführen, vermischt man 100 cm^3 Saft mit so viel Bleiessig, wie zur Klärung nötig ist (10 bis 20 cm^3), schüttelt, filtriert, polarisiert und zieht die Volumvermehrung durch den Bleiessig in Rechnung (siehe S. 127).

Will man in pflanzlichen Materialien, z. B. in Fabriken im Rübenbrei, den Zucker bestimmen, so stellt man aus dem gewogenen Brei ein bestimmtes Volum Extrakt her, klärt dies mit Bleiessig und polarisiert.

Hier sind viele spezielle Vorschriften gegeben, welche man im Buche von *Frühling*[1]) sowie in den „Ausführungsbestimmungen zum Zuckergesetz" nachlesen kann. Hier möge nur angeführt werden, daß das „Normalgewicht" Brei so mit Flüssigkeit extrahiert oder digeriert wird, daß 100 cm^3 Flüssigkeit entstehen, wovon ein Teil polarisiert wird.

Die Extraktion kann mit Wasser (nach *Pellet*) oder mit Alkohol geschehen, die Klärung mit Bleiessig, festem basischen Bleiacetat, Bleinitrat usw.

[1]) *Frühling*, Anleitung zur Untersuchung der für die Zuckerindustrie in Betracht kommenden Rohmaterialien, Produkte, Nebenprodukte und Hilfssubstanzen. 6. Aufl. Braunschweig 1903.

Alle Polarisationen werden mit dem Quarzkeil-Halbschattenapparat mit *Ventzke-Scheibler*scher Skala ausgeführt, welcher das „Normalgewicht" 26·048 *g* zugrunde liegt (siehe oben).

Wenn neben dem Rohrzucker andere optisch wirksame Glykosen, wie z. B. Glukose oder Fruktose, vorhanden, sind, muß man neben der obigen Methode, welche die „direkte Polarisation" des Gemenges angibt, noch die „Inversionspolarisation" bestimmen und hierbei das Folgende bedenken:

Wenn man Rohrzuckerlösung mit Salzsäure auf 69—70° C erwärmt, wird der Rohrzucker in Glukose + Fruktose zerlegt, und das Gemenge besitzt, da Fruktose stärker links als Glukose rechts dreht, eine erhebliche Linksdrehung; folglich besitzt das mit Salzsäure erhitzte Zuckergemenge Linksdrehung oder wenigstens geringere Rechtsdrehung, und diese „Polarisationsverminderung" ist ein Maß für den vorhanden gewesenen Rohrzucker.

Nach den Untersuchungen von *Creydt* [1]) und *Tollens*, welche von *Herzfeld* [2]) erweitert wurden und in den „Ausführungen zum Zuckergesetz" festgelegt sind, entsprechen, wenn genau nach den betreffenden Vorschriften gearbeitet wird, je 100 Skalenteile nach rechts der „direkten Polarisation" oder P, einer „Inversionspolarisation" oder J, von 32·66 Skalenteilen nach links, und folglich findet eine Polarisationsverminderung von 100 + 32·66 = 132·66° Skalenteilen statt.

Die Polarisationsverminderung oder P—J wird meistens mit S bezeichnet, weil sie die Summe der ursprünglichen Rechtsdrehung oder P und der Inversionspolarisation oder J, welche, wenn annähernd reine Rohrzuckerlösung angewandt war, Links oder — ist, bedeutet.

1 Skalenteil der Polarisationsverminderung entspricht also

$$0{\cdot}26048 \times \frac{100}{132{\cdot}66} = 0{\cdot}1963\ g \text{ Rohrzucker.}$$

Hierbei ist vorausgesetzt, daß alle Polarisationen auf dasselbe Volum der Flüssigkeit berechnet sind, und ferner, daß die Inversionspolarisation bei 20° C ausgeführt wurde.

Ist die Inversionspolarisation bei einer anderen Temperatur (t) ausgeführt, so reduziert man sie auf 20°, indem man die Polarisationsverminderung 132·66 für jeden Temperaturgrad über 20° C um 0·5° verkleinert und für jeden Grad unter 20° C um 0·5° vergrößert. Folglich hat man die Formeln

$$\text{Zuckerprozent} = \frac{(P - J)\,.\,100}{142{\cdot}66 - 0{\cdot}5 \times t} \quad \text{oder} \quad \frac{S\,.\,100}{132{\cdot}66 - \left(\frac{t - 20}{2}\right)}$$

Über die Bestimmungen von Rohrzucker mittelst *Fehling*scher Lösung nach der Inversion, sei es für sich, sei es im Gemenge mit Glukose, Fruktose etc., lese man in einem anderen Teile dieses Handbuches

[1]) *R. Creydt*, Die quantitative Bestimmung der Raffinose. Zeitschr. d. Ver. d. Deutschen Zuckerindustrie. Jahrg. **1887**. S. 153.

[2]) *A. Herzfeld*, Zucker- bez. Raffinosebestimmung mittelst der Inversionsmethode. Ebenda. Jahrg. **1890**, S. 194; A. Herzfeld und Dammüller, Ebenda, Jahrg. 1888, S. 749.

nach. Die Inversion kann nach dem obigen Verfahren mit Salzsäure geschehen, sie kann aber auch mit anderen Säuren, z. B. Zitronensäure (siehe bei Milchzucker) oder auch nach *Kulisch*[1]) bei Weinuntersuchungen durch Erhitzen von 100 *cm*³ mit 3 *g* Oxalsäure geschehen.

Man findet näheres über Rohrzuckerinversion in der großen Abhandlung von *Gubbe.*[2])

β) **Maltose,** $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Die Maltose kann man, wenn Glukose, Fruktose etc. beigemengt sind, nur schwierig bestimmen, man ermittelt das Reduktionsvermögen dieser Flüssigkeiten gegen *Fehling*sche oder *Knapp*sche Lösung, und gegen *Barfoed*sche Lösung. Man bestimmt die Polarisation vor und nach der Hydrolyse etc. (siehe *Lippmann*, Die Zuckerarten, S. 1499 ff.).

Geelmuyden[3]) rät, durch eine besondere Hefe (Nr. 583 der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, Seestraße 65), welche die Disaccharide — und so die Maltose — nicht angreift, die Flüssigkeit in Gärung zu versetzen, nach 5 Tagen die Flüssigkeit zu polarisieren und die Drehung auf Maltose zu berechnen.

γ) **Milchzucker,** $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$.

$(\alpha)D$ des Milchzuckers $= + 52{\cdot}53^0$ (siehe *Schmöger*[4]).

Folglich ist 1⁰ des Kreisgradapparates bei Anwendung des 200 *mm*-Rohres $= \frac{100}{52{\cdot}53\ .\ 2} = 0{\cdot}952$ *g* Milchzucker in 100 *cm*³ Flüssigkeit, und 1 Skalenteil des Quarzkeilapparates ist $= 0{\cdot}329$ *g* Milchzucker in 100 *cm*³.

Wenn man trockenen oder kristallisierten Milchzucker zu untersuchen hat, muß man die Mehrdrehung (wohl auch die Wenigerdrehung einer anderen Modifikation des Milchzuckers) des Milchzuckers bedenken, also bei der Auflösung erwärmen oder bis zur Ablesung 24 Stunden warten oder einige Tropfen Ammoniak zusetzen.

Bei der Untersuchung der Milch kann man den Milchzucker nach *Scheibe*[5]) bestimmen, nachdem man Eiweißstoffe und Fett durch Fällung mit Jodquecksilber-Jodkalium gefällt hat.

„75 *cm*³ Milch werden mit 7·5 *cm*³ einer 20⁰/₀igen Schwefelsäure und 7·5 *cm*³ einer Quecksilberlösung versetzt, die wie folgt bereitet wird: 40 *g* Jodkalium werden in 200 *cm*³ Wasser gelöst, mit 55 *g* Quecksilberjodid geschüttelt, zu 500 *cm*³ aufgefüllt und von ungelöstem Quecksilberjodid ab-

[1]) *Kulisch*, Tätigkeitsbericht d. Vers.-Stat. Colmar i. Els. 1904—1906. S. 81.

[2]) *O. Gubbe*, Über das optische Drehungsvermögen des Invertzuckers. Zeitschr. d. Ver. d. Deutschen Zuckerindustrie. Jahrg. 1884. S. 1345

[3]) *H. Chr. Geelmuyden*, Entwurf einer Methode zur quantitativen Bestimmung mehrerer Zuckerarten nebeneinander in diabetischem Harn. Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. 48. S. 137 (1909).

[4]) *M. Schmöger*, Das spezifische Drehungsvermögen des Milchzuckers. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 13. S. 1922 (1880).

[5]) *Dr. Anton Scheibe*, Die Bestimmung des Milchzuckers in der Milch durch Polarisation und Reduktion. Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. 40. S. 1 (1901); siehe auch *Königs* Untersuchung landwirtschaftl. und gewerbl. wichtiger Stoffe. S. 471.

filtriert. Nach dem Auffüllen der mit den Klärmitteln versetzten Milch zu 100 cm^3 wird das Filtrat im 400 *mm*-Rohr bei 17·5° polarisiert."

„Zur Beseitigung des durch das Volum des Niederschlags hervorgerufenen Fehlers ist nach *A. Scheibe* bei Vollmilch (mit 2·8—4·7% Fettgehalt) der gefundene Milchzuckergehalt mit 0·94 und bei Magermilch mit 0·97 zu multiplizieren."

Bleiessig darf man nach *Scheibe* nicht zur Klärung der Milch anwenden, weil mit dem Niederschlag etwas Milchzucker niedergeschlagen werden soll.

Wenn neben dem Milchzucker (wie in der kondensierten Milch) Rohrzucker vorhanden sein kann, muß man die geklärte Flüssigkeit einmal direkt und dann nach Inversion des Rohrzuckers prüfen. Hierzu hat *Herzfeld*[1]) eine Vorschrift gegeben, welche ins Zuckergesetz eingeführt ist.

100 *g* kondensierter Milch werden mit Wasser und 20 cm^3 Bleiessig zu 500 cm^3 gebracht und filtriert.

a) Direkte Polarisation: 75 cm^3 des Filtrats vom Bleiessigniederschlage werden mit etwas Aluminiumhydroxyd und Wasser zu 100 cm^3 aufgefüllt und polarisiert.

b) 75 cm^3 des Filtrats vom Bleiessigniederschlage werden mit 5 cm^3 Salzsäure von 1·19 spez. Gew. genau, wie es zur Rohrzucker-Inversionspolarisation vorgeschrieben ist, im Wasserbade erwärmt, dann zu 100 cm^3 aufgefüllt und bei 20° C polarisiert.

Die Formeln zur Berechnung auf Zuckerprozente findet man a. a. O. und im Zuckergesetze.

Die Methode beruht darauf, daß Milchzucker der Hydrolyse schwerer verfällt als der Rohrzucker und unter den angegebenen Bedingungen nicht merklich zerlegt wird. Auch Zitronensäure bewirkt die Inversion des Rohrzuckers, ohne den Milchzucker anzugreifen.

Annähernd kann man nach *Bauer* den im Harn befindlichen Milchzucker durch Oxydation mit Salpetersäure zu Schleimsäure bestimmen (siehe bei Galaktose).

δ) Raffinose, Melitose, Melitriose, $C_{18}H_{32}O_{16} + 5\,H_2O$.

Dieser in geringer Menge in den Rüben, in größerer Menge in Rübenmelasse, in Baumwollsamen und in der Manna von australischen Eukalyptusbäumen vorkommende Zucker enthält die 3 Glykosen: Glukose, Galaktose und Fruktose.

Seine Drehung ist recht hoch, $(\alpha)D = +104—105°$. Im 200 *mm*-Rohr ist je 1° Kreisdrehung $= \frac{100}{104·4\,.\,2} = 0·479$ *g* kristallisierter Raffinose 1 Skalenteil des Quarzkeilapparates = 0·1657 *g* kristallisierter Raffinose oder = 0·1406 *g* wasserfreier Raffinose in 100 cm^3. Die wasserfreie Raffinose polarisiert also $\frac{0·26048}{0·1406} = 1·85$mal so stark als Rohrzucker.

[1]) Änderung der Ausführungsbestimmungen zum Zuckergesetz. Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1897**. Allg. Teil. S. 366.

Man kann die Raffinose nach *Creydt*[1]) aus der Schleimsäureausbeute beim Oxydieren mit Salpetersäure bestimmen.

Gewöhnlich wird sie aber in von der Zuckerfabrikation herrührenden Sirupen nach der im Zuckergesetz befindlichen, von *Herzfeld*[2 u. 3]) formulierten Vorschrift bestimmt (siehe auch *Creydt*[4]).

Die Methode beruht darauf, daß bei den angegebenen Bedingungen der Hydrolyse oder Inversion die anfängliche Rechtsdrehung des Rohrzuckers sich im Verhältnis $+100 : \div 32{\cdot}66$ in Linksdrehung verwandelt, die Rechtsdrehung der Raffinose sich aber nur im Verhältnis $+100 : +51{\cdot}24$ vermindert, ohne in Linksdrehung überzugehen. Hierbei entsteht eine Spaltung der Raffinose in Fruktose und ein aus Glukose und Galaktose zusammengesetztes Di-Saccharid, die Melibiose, von *Scheibler*[5]) und *Bau*[6]), welch letzterer sie kristallisiert erhielt.

Man polarisiert Zucker, welcher Raffinose enthält, im 200 *mm*-Rohr des Quarzkeilapparates und bei Anwendung des Normalgewichts 26·048 *g* auf 100 *cm*³

a) direkt = P;

b) nach der Inversion oder Hydrolyse, welche genau wie die Inversion des Rohrzuckers ausgeführt wird, indem man mit dem halben Normalgewicht auf 100 *cm*³ operiert. Falls man wie gewöhnlich mit dem 200 *mm*-Rohr arbeitet, muß man also die Drehung der invertierten Flüssigkeit verdoppeln; man hat dann die Inversionspolarisation oder J.

Wenn P die beobachtete Polarisation vor der Inversion und J die nach der Inversion beobachtete (verdoppelte) Polarisation sind, und wenn Z die Prozente an Zucker und R die Prozente an Raffinose bezeichnen, so hat man

$$\text{I. } P = Z + 1{\cdot}852\,R \quad \text{und} \quad \text{II. } J = -0{\cdot}3266\,Z + 1{\cdot}85\,R \,.\, 0{\cdot}5124$$

Multipliziert man die Gleichung I. mit 0·5124, so hat man:

$$\text{III. } 0{\cdot}5124\,P = 0{\cdot}5124\,Z + 1{\cdot}85\,R \;\; 0{\cdot}5124.$$

zieht man II. $J = -0{\cdot}3265\,Z + 1{\cdot}85\,R \,.\, 0{\cdot}5124$ von III. ab, so hat man:

$$\text{IV. } 0{\cdot}5124\,P - J = 0{\cdot}839\,Z \text{ und}$$

$$Z = \frac{0{\cdot}5124\,(P - J)}{0{\cdot}839}$$ und ferner unter Zuhilfenahme von I. (siehe oben)

$$R = \frac{P - Z}{1{\cdot}852}$$ oder nach *Baumann*[7]) $= 0{\cdot}5405\,(P - Z)$.

Wenn, wie fast immer, J, d. h. die Inversionspolarisation, links ist, muß sie nicht von 0·5124 P abgezogen, sondern addiert werden (s. S. 150).

---

[1]) *R. Creydt,* Die quantitative Bestimmung der Raffinose. Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1887**. S. 167.

[2]) *Herzfeld* und *Dammüller,* Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1888**. S. 749.

[3]) *Herzfeld,* Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1890**. S. 194.

[4]) *R. Creydt,* Die quantitative Bestimmung der Raffinose. Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1887**. S. 155.

[5]) *C. Scheibler* und *H. Mittelmeier,* Weitere Beiträge zur Kenntnis der Melitriose und der Melibiose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. S. 1438 (1890).

[6]) *Arminius Bau,* Über kristallisierte Melibiose. Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1899**. Techn. Teil. S. 850.

[7]) *Baumann,* Tabellen zur Berechnung der Inversionspolarisation. Zeitschr. d. Ver. d. d. Zuckerindustrie. Jg. **1898**. Techn. Teil. S. 786.

ANHANG.

Kröbers Tabelle zur Umwandlung von Phlorogluzid in Furfurol, Pentosan usw. (s. S. 132).

Phlorogluzid	Furfurol	Arabinose	Araban	Xylose	Xylan	Pentose	Pentosan
0·030	0·0182	0·0391	0·0344	0·0324	0·0285	0·0358	0·0315
0·031	0·0188	0·0402	0·0354	0·0333	0·0293	0·0368	0·0324
0·032	0·0193	0·0413	0·0363	0·0342	0·0301	0·0378	0·0333
0·033	0·0198	0·0424	0·0373	0·0352	0·0309	0·0388	0·0341
0·034	0·0203	0·0435	0·0383	0·0361	0·0317	0·0398	0·0350
0·035	0·0209	0·0446	0·0393	0·0370	0·0326	0·0408	0·0359
0·036	0·0214	0·0457	0·0402	0·0379	0·0334	0·0418	0·0368
0·037	0·0219	0·0468	0·0412	0·0388	0·0342	0·0428	0·0377
0·038	0·0224	0·0479	0·0422	0·0398	0·0350	0·0439	0·0386
0·039	0·0229	0·0490	0·0431	0·0407	0·0358	0·0449	0·0395
0·040	0·0235	0·0501	0·0441	0·0416	0·0366	0·0459	0·0404
0·041	0·0240	0·0512	0·0451	0·0425	0·0374	0·0469	0·0413
0·042	0·0245	0·0523	0·0460	0·0434	0·0382	0·0479	0·0422
0·043	0·0250	0·0534	0·0470	0·0443	0·0390	0·0489	0·0431
0·044	0·0255	0·0545	0·0480	0·0452	0·0398	0·0499	0·0440
0·045	0·0260	0·0556	0·0490	0·0462	0·0406	0·0509	0·0448
0·046	0·0266	0·0567	0·0499	0·0471	0·0414	0·0519	0·0457
0·047	0·0271	0·0578	0·0509	0·0480	0·0422	0·0529	0·0466
0·048	0·0276	0·0589	0·0519	0·0489	0·0430	0·0539	0·0475
0·049	0·0281	0·0600	0·0528	0·0498	0·0438	0·0549	0·0484
0·050	0·0286	0·0611	0·0538	0·0507	0·0446	0·0559	0·0492
0·051	0·0292	0·0622	0·0548	0·0516	0·0454	0·0569	0·0501
0·052	0·0297	0·0633	0·0557	0·0525	0·0462	0·0579	0·0510
0·053	0·0302	0·0644	0·0567	0·0534	0·0470	0·0589	0·0519
0·054	0·0307	0·0655	0·0576	0·0543	0·0478	0·0599	0·0528
0·055	0·0312	0·0666	0·0586	0·0553	0·0486	0·0610	0·0537
0·056	0·0318	0·0677	0·0596	0·0562	0·0494	0·0620	0·0546
0·057	0·0323	0·0688	0·0605	0·0571	0·0502	0·0630	0·0555
0·058	0·0328	0·0699	0·0615	0·0580	0·0510	0·0640	0·0564
0·059	0·0333	0·0710	0·0624	0·0589	0·0518	0·0650	0·0573
0·060	0·0338	0·0721	0·0634	0·0598	0·0526	0·0660	0·0581
0·061	0·0344	0·0732	0·0644	0·0607	0·0534	0·0670	0·0590
0·062	0·0349	0·0743	0·0653	0·0616	0·0542	0·0680	0·0599
0·063	0·0354	0·0754	0·0663	0·0626	0·0550	0·0690	0·0608
0·064	0·0359	0·0765	0·0673	0·0635	0·0558	0·0700	0·0617
0·065	0·0364	0·0776	0·0683	0·0644	0·0567	0·0710	0·0625
0·066	0·0370	0·0787	0·0692	0·0653	0·0575	0·0720	0·0634
0·067	0·0375	0·0798	0·0702	0·0662	0·0583	0·0730	0·0643
0·068	0·0380	0·0809	0·0712	0·0672	0·0591	0·0741	0·0652
0·069	0·0385	0·0820	0·0721	0·0681	0·0599	0·0751	0·0661
0·070	0·0390	0·0831	0·0731	0·0690	0·0607	0·0761	0·0670
0·071	0·0396	0·0842	0·0741	0·0699	0·0615	0·0771	0·0679
0·072	0·0401	0·0853	0·0750	0·0708	0·0623	0·0781	0·0688
0·073	0·0406	0·0864	0·0760	0·0717	0·0631	0·0791	0·0697
0·074	0·0411	0·0875	0·0770	0·0726	0·0639	0·0801	0·0706
0·075	0·0416	0·0886	0·0780	0·0736	0·0647	0·0811	0·0714
0·076	0·0422	0·0897	0·0789	0·0745	0·0655	0·0821	0·0722
0·077	0·0427	0·0908	0·0799	0·0754	0·0663	0·0831	0·0731
0·078	0·0432	0·0919	0·0809	0·0763	0·0671	0·0841	0·0740
0·079	0·0437	0·0930	0·0818	0·0772	0·0679	0·0851	0·0749
0·080	0·0442	0·0941	0·0828	0·0781	0·0687	0·0861	0·0758
0·081	0·0448	0·0952	0·0838	0·0790	0·0695	0·0871	0·0767
0·082	0·0453	0·0963	0·0847	0·0799	0·0703	0·0881	0·0776
0·083	0·0458	0·0974	0·0857	0·0808	0·0711	0·0891	0·0785
0·084	0·0463	0·0985	0·0867	0·0817	0·0719	0·0901	0·0794

Phloro-gluzid	Furfurol	Arabinose	Araban	Xylose	Xylan	Pentose	Pentosan
0·085	0·0468	0·0996	0·0877	0·0827	0·0727	0·0912	0·0803
0·086	0·0474	0·1007	0·0886	0·0836	0·0735	0·0922	0·0812
0·087	0·0479	0·1018	0·0896	0·0845	0·0743	0·0932	0·0821
0·088	0·0484	0·1029	0·0906	0·0854	0·0751	0·0942	0·0830
0·089	0·0489	0·1040	0·0915	0·0863	0·0759	0·0952	0·0838
0·090	0·0494	0·1051	0·0925	0·0872	0·0767	0·0962	0·0847
0·091	0·0499	0·1062	0·0935	0·0881	0·0775	0·0972	0·0856
0·092	0·0505	0·1073	0·0944	0·0890	0·0783	0·0982	0·0865
0·093	0·0510	0·1084	0·0954	0·0900	0·0791	0·0992	0·0874
0·094	0·0515	0·1095	0·0964	0·0909	0·0800	0·1002	0·0883
0·095	0·0520	0·1106	0·0974	0·0918	0·0808	0·1012	0·0891
0·096	0·0525	0·1117	0·0983	0·0927	0·0816	0·1022	0·0899
0·097	0·0531	0·1128	0·0993	0·0936	0·0824	0·1032	0·0908
0·098	0·0536	0·1139	0·1003	0·0946	0·0832	0·1043	0·0917
0·099	0·0541	0·1150	0·1012	0·0955	0·0840	0·1053	0·0926
0·100	0·0546	0·1161	0·1022	0·0964	0·0848	0·1063	0·0935
0·101	0·0551	0·1171	0·1032	0·0973	0·0856	0·1073	0·0944
0·102	0·0557	0·1182	0·1041	0·0982	0·0864	0·1083	0·0953
0·103	0·0562	0·1193	0·1051	0·0991	0·0872	0·1093	0·0962
0·104	0·0567	0·1204	0·1060	0·1000	0·0880	0·1103	0·0971
0·105	0·0572	0·1215	0·1070	0·1010	0·0888	0·1113	0·0979
0·106	0·0577	0·1226	0·1080	0·1019	0·0896	0·1123	0·0988
0·107	0·0582	0·1237	0·1089	0·1028	0·0904	0·1133	0·0997
0·108	0·0588	0·1248	0·1099	0·1037	0·0912	0·1143	0·1006
0·109	0·0593	0·1259	0·1108	0·1046	0·0920	0·1153	0·1015
0·110	0·0598	0·1270	0·1118	0·1055	0·0928	0·1163	0·1023
0·111	0·0603	0·1281	0·1128	0·1064	0·0936	0·1173	0·1032
0·112	0·0608	0·1292	0·1137	0·1073	0·0944	0·1183	0·1041
0·113	0·0614	0·1303	0·1147	0·1082	0·0952	0·1193	0·1050
0·114	0·0619	0·1314	0·1156	0·1091	0·0960	0·1203	0·1059
0·115	0·0624	0·1325	0·1166	0·1101	0·0968	0·1213	0·1067
0·116	0·0629	0·1336	0·1176	0·1110	0·0976	0·1223	0·1076
0·117	0·0634	0·1347	0·1185	0·1119	0·0984	0·1233	0·1085
0·118	0·0640	0·1358	0·1195	0·1128	0·0992	0·1243	0·1094
0·119	0·0645	0·1369	0·1204	0·1137	0·1000	0·1253	0·1103
0·120	0·0650	0·1380	0·1214	0·1146	0·1008	0·1263	0·1111
0·121	0·0655	0·1391	0·1224	0·1155	0·1016	0·1273	0·1120
0·122	0·0660	0·1402	0·1233	0·1164	0·1024	0·1283	0·1129
0·123	0·0665	0·1413	0·1243	0·1173	0·1032	0·1293	0·1138
0·124	0·0671	0·1424	0·1253	0·1182	0·1040	0·1303	0·1147
0·125	0·0676	0·1435	0·1263	0·1192	0·1049	0·1314	0·1156
0·126	0·0681	0·1446	0·1272	0·1201	0·1057	0·1324	0·1165
0·127	0·0686	0·1457	0·1282	0·1210	0·1065	0·1334	0·1174
0·128	0·0691	0·1468	0·1292	0·1219	0·1073	0·1344	0·1183
0·129	0·0697	0·1479	0·1301	0·1228	0·1081	0·1354	0·1192
0·130	0·0702	0·1490	0·1311	0·1237	0·1089	0·1364	0·1201
0·131	0·0707	0·1501	0·1321	0·1246	0·1097	0·1374	0·1210
0·132	0·0712	0·1512	0·1330	0·1255	0·1105	0·1384	0·1219
0·133	0·0717	0·1523	0·1340	0·1264	0·1113	0·1394	0·1227
0·134	0·0723	0·1534	0·1350	0·1273	0·1121	0·1404	0·1236
0·135	0·0728	0·1545	0·1360	0·1283	0·1129	0·1414	0·1244
0·136	0·0733	0·1556	0·1369	0·1292	0·1137	0·1424	0·1253
0·137	0·0738	0·1567	0·1379	0·1301	0·1145	0·1434	0·1262
0·138	0·0743	0·1578	0·1389	0·1310	0·1153	0·1444	0·1271
0·139	0·0748	0·1589	0·1398	0·1319	0·1161	0·1454	0·1280
0·140	0·0754	0·1600	0·1408	0·1328	0·1169	0·1464	0·1288
0·141	0·0759	0·1611	0·1418	0·1337	0·1177	0·1474	0·1297

Phloroglucid	Furfurol	Arabinose	Araban	Xylose	Xylan	Pentose	Pentosan
0·142	0·0764	0·1622	0·1427	0·1346	0·1185	0·1484	0·1306
0·143	0·0769	0·1633	0·1437	0·1355	0·1193	0·1494	0·1315
0·144	0·0774	0·1644	0·1447	0·1364	0·1201	0·1504	0·1324
0·145	0·0780	0·1655	0·1457	0·1374	0·1209	0·1515	0·1333
0·146	0·0785	0·1666	0·1466	0·1383	0·1217	0·1525	0·1342
0·147	0·0790	0·1677	0·1476	0·1392	0·1225	0·1535	0·1351
0·148	0·0795	0·1688	0·1486	0·1401	0·1233	0·1545	0·1360
0·149	0·0800	0·1699	0·1495	0·1410	0·1241	0·1555	0·1369
0·150	0·0805	0·1710	0·1505	0·1419	0·1249	0·1565	0·1377
0·151	0·0811	0·1721	0·1515	0·1428	0·1257	0·1575	0·1386
0·152	0·0816	0·1732	0·1524	0·1437	0·1265	0·1585	0·1395
0·153	0·0821	0·1743	0·1534	0·1446	0·1273	0·1595	0·1404
0·154	0·0826	0·1754	0·1544	0·1455	0·1281	0·1605	0·1413
0·155	0·0831	0·1765	0·1554	0·1465	0·1289	0·1615	0·1421
0·156	0·0837	0·1776	0·1563	0·1474	0·1297	0·1625	0·1430
0·157	0·0842	0·1787	0·1573	0·1483	0·1305	0·1635	0·1439
0·158	0·0847	0·1798	0·1583	0·1492	0·1313	0·1645	0·1448
0·159	0·0852	0·1809	0·1592	0·1501	0·1321	0·1655	0·1457
0·160	0·0857	0·1820	0·1602	0·1510	0·1329	0·1665	0·1465
0·161	0·0863	0·1831	0·1612	0·1519	0·1337	0·1675	0·1474
0·162	0·0868	0·1842	0·1621	0·1528	0·1345	0·1685	0·1483
0·163	0·0873	0·1853	0·1631	0·1537	0·1353	0·1695	0·1492
0·164	0·0878	0·1864	0·1640	0·1546	0·1361	0·1705	0·1501
0·165	0·0883	0·1875	0·1650	0·1556	0·1369	0·1716	0·1510
0·166	0·0888	0·1886	0·1660	0·1565	0·1377	0·1726	0·1519
0·167	0·0[illegible]94	0·1897	0·1669	0·1574	0·1385	0·1736	0·1528
0·168	0·0899	0·1908	0·1679	0·1583	0·1393	0·1746	0·1537
0·169	0·0904	0·1919	0·1688	0·1592	0·1401	0·1756	0·1546
0·170	0·0909	0·1930	0·1698	0·1601	0·1409	0·1766	0·1554
0·171	0·0914	0·1941	0·1708	0·1610	0·1417	0·1776	0·1563
0·172	0·0920	0·1952	0·1717	0·1619	0·1425	0·1786	0·1572
0·173	0·0925	0·1963	0·1727	0·1628	0·1433	0·1796	0·1581
0·174	0·0930	0·1974	0·1736	0·1637	0·1441	0·1806	0·1590
0·175	0·0935	0·1985	0·1746	0·1647	0·1449	0·1816	0·1598
0·176	0·0940	0·1996	0·1756	0·1656	0·1457	0·1826	0·1607
0·177	0·0946	0·2007	0·1765	0·1665	0·1465	0·1836	0·1616
0·178	0·0951	0·2018	0·1775	0·1674	0·1473	0·1846	0·1625
0·179	0·0956	0·2029	0·1784	0·1683	0·1481	0·1856	0·1634
0·180	0·0961	0·2039	0·1794	0·1692	0·1489	0·1866	0·1642
0·181	0·0966	0·2050	0·1804	0·1701	0·1497	0·1876	0·1651
0·182	0·0971	0·2061	0·1813	0·1710	0·1505	0·1886	0·1660
0·183	0·0977	0·2072	0·1823	0·1719	0·1513	0·1896	0·1669
0·184	0·0982	0·2082	0·1832	0·1728	0·1521	0·1906	0·1678
0·185	0·0987	0·2093	0·1842	0·1738	0·1529	0·1916	0·1686
0·186	0·0992	0·2104	0·1851	0·1747	0·1537	0·1926	0·1695
0·187	0·0997	0·2115	0·1861	0·1756	0·1545	0·1936	0·1704
0·188	0·1003	0·2126	0·1870	0·1765	0·1553	0·1946	0·1712
0·189	0·1008	0·2136	0·1880	0·1774	0·1561	0·1955	0·1721
0·190	0·1013	0·2147	0·1889	0·1783	0·1569	0·1965	0·1729
0·191	0·1018	0·2158	0·1899	0·1792	0·1577	0·1975	0·1738
0·192	0·1023	0·2168	0·1908	0·1801	0·1585	0·1985	0·1747
0·193	0·1028	0·2179	0·1918	0·1810	0·1593	0·1995	0·1756
0·194	0·1034	0·2190	0·1927	0·1819	0·1601	0·2005	0·1764
0·195	0·1039	0·2201	0·1937	0·1829	0·1609	0·2015	0·1773
0·196	0·1044	0·2212	0·1946	0·1838	0·1617	0·2025	0·1782
0·197	0·1049	0·2222	0·1956	0·1847	0·1625	0·2035	0·1791
0·198	0·1054	0·2233	0·1965	0·1856	0·1633	0·2045	0·1800

Phloroglucid	Furfurol	Arabinose	Araban	Xylose	Xylan	Pentose	Pentosan
0·199	0·1059	0·2244	0·1975	0·1865	0·1641	0·2055	0·1808
0·200	0·1065	0·2255	0·1984	0·1874	0·1649	0·2065	0·1817
0·201	0·1070	0·2266	0·1994	0·1883	0·1657	0·2075	0·1826
0·202	0·1075	0·2276	0·2003	0·1892	0·1665	0·2085	0·1835
0·203	0·1080	0·2287	0·2013	0·1901	0·1673	0·2095	0·1844
0·204	0·1085	0·2298	0·2022	0·1910	0·1681	0·2105	0·1853
0·205	0·1090	0·2309	0·2032	0·1920	0·1689	0·2115	0·1861
0·206	0·1096	0·2320	0·2041	0·1929	0·1697	0·2125	0·1869
0·207	0·1101	0·2330	0·2051	0·1938	0·1705	0·2134	0·1878
0·208	0·1106	0·2341	0·2060	0·1947	0·1713	0·2144	0·1887
0·209	0·1111	0·2352	0·2069	0·1956	0·1721	0·2154	0·1896
0·210	0·1116	0·2363	0·2079	0·1965	0·1729	0·2164	0·1904
0·211	0·1121	0·2374	0·2089	0·1975	0·1737	0·2174	0·1913
0·212	0·1127	0·2384	0·2098	0·1984	0·1745	0·2184	0·1922
0·213	0·1132	0·2395	0·2108	0·1993	0·1753	0·2194	0·1931
0·214	0·1137	0·2406	0·2117	0·2002	0·1761	0·2204	0·1940
0·215	0·1142	0·2417	0·2127	0·2011	0·1770	0·2214	0·1948
0·216	0·1147	0·2428	0·2136	0·2020	0·1778	0·2224	0·1957
0·217	0·1152	0·2438	0·2146	0·2029	0·1786	0·2234	0·1966
0·218	0·1158	0·2449	0·2155	0·2038	0·1794	0·2244	0·1974
0·219	0·1163	0·2460	0·2165	0·2047	0·1802	0·2254	0·1983
0·220	0·1168	0·2471	0·2174	0·2057	0·1810	0·2264	0·1992
0·221	0·1173	0·2482	0·2184	0·2066	0·1818	0·2274	0·2001
0·222	0·1178	0·2492	0·2193	0·2075	0·1826	0·2284	0·2010
0·223	0·1183	0·2503	0·2203	0·2084	0·1834	0·2294	0·2019
0·224	0·1189	0·2514	0·2212	0·2093	0·1842	0·2304	0·2028
0·225	0·1194	0·2525	0·2222	0·2102	0·1850	0·2314	0·2037
0·226	0·1199	0·2536	0·2232	0·2111	0·1858	0·2324	0·2046
0·227	0·1204	0·2546	0·2241	0·2121	0·1866	0·2334	0·2054
0·228	0·1209	0·2557	0·2251	0·2130	0·1874	0·2344	0·2063
0·229	0·1214	0·2568	0·2260	0·2139	0·1882	0·2354	0·2072
0·230	0·1220	0·2579	0·2270	0·2148	0·1890	0·2364	0·2081
0·231	0·1225	0·2590	0·2280	0·2157	0·1898	0·2374	0·2089
0·232	0·1230	0·2600	0·2289	0·2166	0·1906	0·2383	0·2097
0·233	0·1235	0·2611	0·2299	0·2175	0·1914	0·2393	0·2106
0·234	0·1240	0·2622	0·2308	0·2184	0·1922	0·2403	0·2115
0·235	0·1245	0·2633	0·2318	0·2193	0·1930	0·2413	0·2124
0·236	0·1251	0·2644	0·2327	0·2202	0·1938	0·2423	0·2132
0·237	0·1256	0·2654	0·2337	0·2211	0·1946	0·2433	0·2141
0·238	0·1261	0·2665	0·2346	0·2220	0·1954	0·2443	0·2150
0·239	0·1266	0·2676	0·2356	0·2229	0·1962	0·2453	0·2159
0·240	0·1271	0·2687	0·2365	0·2239	0·1970	0·2463	0·2168
0·241	0·1276	0·2698	0·2375	0·2248	0·1978	0·2473	0·2176
0·242	0·1281	0·2708	0·2384	0·2257	0·1986	0·2483	0·2185
0·243	0·1287	0·2719	0·2394	0·2266	0·1994	0·2493	0·2194
0·244	0·1292	0·2730	0·2403	0·2275	0·2002	0·2503	0·2203
0·245	0·1297	0·2741	0·2413	0·2284	0·2010	0·2513	0·2212
0·246	0·1302	0·2752	0·2422	0·2293	0·2018	0·2523	0·2220
0·247	0·1307	0·2762	0·2432	0·2302	0·2026	0·2533	0·2229
0·248	0·1312	0·2773	0·2441	0·2311	0·2034	0·2543	0·2338
0·249	0·1318	0·2784	0·2451	0·2320	0·2042	0·2553	0·2247
0·250	0·1323	0·2795	0·2460	0·2330	0·2050	0·2563	0·2256
0·251	0·1328	0·2806	0·2470	0·2339	0·2058	0·2573	0·2264
0·252	0·1333	0·2816	0·2479	0·2348	0·2066	0·2582	0·2272
0·253	0·1338	0·2827	0·2489	0·2357	0·2074	0·2592	0·2281
0·254	0·1343	0·2838	0·2498	0·2366	0·2082	0·2602	0·2290
0·255	0·1349	0·2849	0·2508	0·2375	0·2090	0·2612	0·2299

Phloro-gluzid	Furfurol	Arabinose	Araban	Xylose	Xylan	Pentose	Pentosan
0·256	0·1354	0·2860	0·2517	0·2384	0·2098	0·2622	0·2307
0·257	0·1359	0·2870	0·2526	0·2393	0·2106	0·2632	0·2316
0·258	0·1364	0·2881	0·2536	0·2402	0·2114	0·2642	0·2325
0·259	0·1369	0·2892	0·2545	0·2411	0·2122	0·2652	0·2334
0·260	0·1374	0·2903	0·2555	0·2420	0·2130	0·2662	0·2342
0·261	0·1380	0·2914	0·2565	0·2429	0·2138	0·2672	0·2351
0·262	0·1385	0·2924	0·2574	0·2438	0·2146	0·2681	0·2359
0·263	0·1390	0·2935	0·2584	0·2447	0·2154	0·2691	0·2368
0·264	0·1395	0·2946	0·2593	0·2456	0·2162	0·2701	0·2377
0·265	0·1400	0·2957	0·2603	0·2465	0·2170	0·2711	0·2385
0·266	0·1405	0·2968	0·2612	0·2474	0·2178	0·2721	0·2394
0·267	0·1411	0·2978	0·2622	0·2483	0·2186	0·2731	0·2403
0·268	0·1416	0·2989	0·2631	0·2492	0·2194	0·2741	0·2412
0·269	0·1421	0·3000	0·2641	0·2502	0·2202	0·2751	0·2421
0·270	0·1426	0·3011	0·2650	0·2511	0·2210	0·2761	0·2429
0·271	0·1431	0·3022	0·2660	0·2520	0·2218	0·2771	0·2438
0·272	0·1436	0·3032	0·2669	0·2529	0·2226	0·2781	0·2447
0·273	0·1442	0·3043	0·2679	0·2538	0·2234	0·2791	0·2456
0·274	0·1447	0·3054	0·2688	0·2547	0·2242	0·2801	0·2465
0·275	0·1452	0·3065	0·2698	0·2556	0·2250	0·2811	0·2473
0·276	0·1457	0·3076	0·2707	0·2565	0·2258	0·2821	0·2482
0·277	0·1462	0·3086	0·2717	0·2574	0·2266	0·2830	0·2490
0·278	0·1467	0·3097	0·2726	0·2583	0·2274	0·2840	0·2499
0·279	0·1473	0·3108	0·2736	0·2592	0·2282	0·2850	0·2508
0·280	0·1478	0·3119	0·2745	0·2602	0·2290	0·2861	0·2517
0·281	0·1483	0·3130	0·2755	0·2611	0·2298	0·2871	0·2526
0·282	0·1488	0·3140	0·2764	0·2620	0·2306	0·2880	0·2534
0·283	0·1493	0·3151	0·2774	0·2629	0·2314	0·2890	0·2543
0·284	0·1498	0·3162	0·2783	0·2638	0·2322	0·2900	0·2552
0·285	0·1504	0·3173	0·2793	0·2647	0·2330	0·2910	0·2561
0·286	0·1509	0·3184	0·2802	0·2656	0·2338	0·2920	0·2570
0·287	0·1514	0·3194	0·2812	0·2665	0·2346	0·2930	0·2578
0·288	0·1519	0·3205	0·2821	0·2674	0·2354	0·2940	0·2587
0·289	0·1524	0·3216	0·2831	0·2683	0·2362	0·2950	0·2596
0·290	0·1529	0·3227	0·2840	0·2693	0·2370	0·2960	0·2605
0·291	0·1535	0·3238	0·2850	0·2702	0·2378	0·2970	0·2614
0·292	0·1540	0·3248	0·2859	0·2711	0·2386	0·2980	0·2622
0·293	0·1545	0·3259	0·2868	0·2720	0·2394	0·2990	0·2631
0·294	0·1550	0·3270	0·2878	0·2729	0·2402	0·3000	0·2640
0·295	0·1555	0·3281	0·2887	0·2738	0·2410	0·3010	0·2649
0·296	0·1560	0·3292	0·2897	0·2747	0·2418	0·3020	0·2658
0·297	0·1566	0·3302	0·2906	0·2756	0·2426	0·3030	0·2666
0·298	0·1571	0·3313	0·2916	0·2765	0·2434	0·3040	0·2675
0·299	0·1576	0·3324	0·2925	0·2774	0·2442	0·3050	0·2684
0·300	0·1581	0·3335	0·2935	0·2784	0·2450	0·3060	0·2693

Nachweis, Darstellung und quantitative Bestimmung des Glykogens.

Von **Karl Grube**, Bonn-Neuenahr.

I. Eigenschaften.

Das Glykogen ist ein feines, weißes, amorphes, geruch- und geschmackloses Pulver. Wässerige Lösungen desselben opaleszieren. Es hat nach den übereinstimmenden Analysen von *Kekulé*[1]) und *Nerking*[2]), die beide aschefreies Material verwandten, die Formel $(C_6 H_{10} O_5)$ n und enthält im Molekül kein Konstitutionswasser.

Es dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts; die spezifische Drehung beträgt nach Mme *Gatin-Gruzewska*, die mit absolut reinem Glykogen arbeitete[3]), 196·57°.

Die Verbrennungswärme beträgt für 1 *g* 4190·6 Kalorien, für 1 Gramm-Molekül 678·9 Kalorien. Durch verdünnte Jodlösung wird es rotbraun gefärbt.

Durch Barythydrat, Essigsäure, Gerbsäure, Phosphorwolframsäure wird es aus wässerigen Lösungen gefällt[4]), durch Magnesium- und Ammoniumsulfat wird es ausgesalzen.[5])

Es reduziert die *Fehling*sche Lösung nicht, bildet kein Osazon und wird durch Hefe nicht vergoren.

Mit starker Kalilauge kann es gekocht werden, ohne daß es sich zersetzt[6]), durch schwache Lauge wird es angegriffen.[7])

---

[1]) Verh. des naturh.-med. Vereins zu Heidelberg. 1858, 17. Januar.

[2]) *Nerking*, Über die elementare Zusammensetzung des Glykogens. *Pflügers* Archiv. Bd. **85**. S. 320 (1901).

[3]) *Gatin-Gruzewska*, Das reine Glykogen. *Pflügers* Archiv. Bd. **102**. S. 569 (1904).

[4]) *O. Nasse*, Über Verbindungen des Glykogens. *Pflügers* Archiv. Bd. **37**. S. 582 (1885).

[5]) *O. Nasse*, Über das Aussalzen der Eiweißkörper und anderer kolloider Substanzen. *Pflügers* Archiv. Bd. **41**. S. 504 (1887).

[6]) *E. Pflüger*, Über das Verhalten des Glykogens in siedender Kalilauge. *Pflügers* Archiv. Bd. **92**. S. 81 (1902).

[7]) *E. Pflüger*, Über die Einwirkung verdünnter Kalilauge auf Glykogen bei 100° C. *Pflügers* Archiv. Bd. **93**. S. 77 (1903).

Durch Salzsäure und andere Mineralsäuren sowie durch Diastase wird es in Traubenzucker umgewandelt, und zwar wird das Maximum der Überführung erreicht mit 2·2%iger Salzsäure und einer Kochdauer von 3 Stunden.[1]

II. Nachweis.

1. Mikrochemisch.[2]

a) Am frischen Organ. Von dem zu untersuchenden Organ werden Schnitte oder Abstrichpräparate angefertigt und diese mit verdünnter Jodlösung gefärbt. Es tritt Rotbraunfärbung des Glykogens ein. Man verwendet entweder die *Lugol*sche Lösung (Jod. pur. 1·0, Kali jodat. 2·0, Aqua dest. 300·0) oder das *Ehrlich*sche Jodgummigemisch (1 Teil *Lugol*scher Lösung und 100 Teile Gummischleim).

Bei diesem Nachweis ist zu beachten, daß das Glykogen durch das Wasser der Lösung sehr bald gelöst wird.

b) Am gehärteten Schnitt. Das zu untersuchende Objekt muß sofort nach der Operation oder möglichst bald nach dem Tode in absolutem Alkohol gehärtet werden. In wässerigen Härtungsflüssigkeiten wird das Glykogen mehr oder weniger schnell aufgelöst, doch kann man die Löslichkeit des Glykogens in Wasser dadurch fast völlig aufheben, daß man die Organstücke in Celloidin einbettet *(Gierke)*. Es wird dann auch durch tagelanges Verweilen der Celloidinschnitte in Wasser weder an der Menge noch der Form des eingelagerten Glykogens das Geringste geändert.

Die Färbung des gehärteten Präparates kann geschehen

I. mit Jod.

a) Durch einfache Jodfärbung, entweder nach *Ehrlich* in der Jodgummimischung oder nach *Barfurth* in einer Mischung von 1 Teil *Lugol*scher Flüssigkeit auf 2 Teile Glyzerin. Die Färbung nach *Barfurth* gibt schöne, durchsichtige Präparate aber von kurzer Haltbarkeit, da wegen der lösenden Wirkung des Glyzerins die charakteristische Jodreaktion bald schwindet.

b) Nach der *Langerhans*schen Methode. 5—15 Minuten lange Färbung in *Lugol*scher Lösung, hierauf Entwässerung in einer Mischung von

---

[1] *W. Grebe,* Kritische Untersuchungen über die quantitative Analyse des Glykogens. *Pflügers* Archiv. Bd. **121**. S. 602 (1908).

[2] *Ehrlich,* Über das Vorkommen von Glykogen im diabetischen und normalen Organismus. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. **6**. S. 33 (1883). — *Bahrfurth,* Vergleichende histochemische Untersuchungen über das Glykogen. Archiv für mikroskop. Anatomie. Bd. **25**. S. 259 (1885). — *Saake,* Studien über Glykogen. Zeitschr. f. Biologie. Bd. XXIX. S. 429 (1893). — *Fichera,* Über die Verteilung des Glykogens in verschiedenen Arten experimenteller Glykosurie. *Zieglers* Beiträge zur pathol. Anatomie. Bd. **36**. S. 273 (1904). — *Gierke,* Das Glykogen in der Morphologie des Zellstoffwechsels. *Zieglers* Beiträge. Bd. **37**. S. 502 (1905). — Artikel „Glykogen" von *Ehrlich* und *Lubarsch* in der Enzyklopädie der mikroskop. Technik.

4 Teilen absoluter Alkohol und 1 Teil offizineller Jodtinktur mit nachfolgender Aufhellung und Konservierung in Origanumöl.

II. Färbung durch einen Farbstoff.

a) Nach *Best.* Einbettung in Celloidin, Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Delafield, Auswaschen in Wasser, Färbung mit Karmin (Karmin 0·5, Ammon. chlorat. 1·0, Lithium carb. 0·2, Aqua dest. 50·0), 15 bis 30 Minuten langes Einlegen in eine Lösung, enthaltend 2 Teile absoluten Alkohol und 1 Teil Liquor ammon. caust., hierauf Auswaschen in Alkohol von 70°, Entwässerung in absolutem Alkohol, Aufhellung in Xylol und Einbettung in Kanadabalsam.

b) Nach *Lubarsch.* Härtung in absolutem Alkohol, Vorfärbung der Schnitte mit salzsaurem alkoholischem Karmin, darauf Färbung mit einer konzentrierten Anilinwassergentianaviolettlösung, 2—4 Minuten lang. Man benutzt dazu 2 Stammlösungen, die sehr haltbar sind, und zwar Lösung I: absoluter Alkohol 33·0, Anilinöl 9·0, Gentianaviolett im Überschuß; Lösung II: konzentrierte wässerige Gentianaviolettlösung.

Von diesen Lösungen mischt man zum Gebrauch 3 Teile von I, mit 17 Teilen von II. Kurzes Abspülen der Schnitte in Wasser, hierauf kurzes (ca. 15 Sekunden) Abspülen in *Graham*scher Jodjodkaliumlösung und gründliches Abtrocknen der Schnitte mit Fließpapier. Entfärben mit Anilinölxylol (2:1) und nachträgliches gründliches Entfernen des Anilinöls durch Xylol. Einbetten in Kanadabalsam. Das Glykogen ist dunkelblau bis violett gefärbt.

2. Chemischer (qualitativer) Nachweis.[1])

Zu demselben dient die zuerst von *Claude Bernard* angegebene Jodreaktion. Je nach der Konzentration der Glykogenlösung schwankt der Farbenton von blassem Gelbbraun durch Rotbraun bis zum tiefen Rot. Die Reaktion ist am empfindlichsten, wenn in der Lösung weder freie Säure noch Alkohol vorhanden sind.

Nach *Pflügers* Vorschrift verfährt man am besten in der Weise, daß man von zwei Reagenzgläsern gleichen Kalibers eins mit Wasser, das andere mit der gleichen Menge der auf Glykogen zu untersuchenden Flüssigkeit beschickt und dann in jedes aus einer Bürette je einen Tropfen einer konzentrierten Jodlösung von etwa 3% fallen läßt. Erhitzt man beide Reagenzgläser gleichzeitig, gleich stark und gleich lang, so verschwindet der vorher vorhandene Farbenunterschied vollkommen, um beim Abkühlen in der Jodglykogenlösung wieder zurückzukehren.

Benutzt man anstatt, wie im vorhergehenden angenommen, einer Lösung von chemisch reinem Glykogen die neutralen Extrakte von Organen, so zeigt sich, daß auch nach Zusatz der Jodlösung zu der Glykogenlösung die Braunfärbung bei ruhigem Stehen in der Kälte verschwindet. Die

[1]) *Pflüger*, Das Glykogen. 2. Aufl. 1905. S. 18ff.

Schnelligkeit; mit der diese Entfärbung eintritt, ist verschieden. Es ist demnach in den Extrakten ein Stoff vorhanden, der das Jod chemisch bindet. Wenn man daher einen derartigen Glykogen enthaltenden Organextrakt nach dem Zusatz von Jod erhitzt, so verschwindet die Jodreaktion sehr schnell und kehrt nach Abkühlung auch nicht wieder. Das läßt sich oft mehrere Male wiederholen mit demselben Resultat und beweist, daß der das Jod bindende Körper bedeutende Jodmengen verschlucken kann, ehe er gesättigt ist. Ist schließlich Sättigung desselben eingetreten, so verhält sich dann der Organextrakt wie die Lösung reinen Glykogens. Ein Tropfen Jod erzeugt die charakteristische Färbung, welche beim Erhitzen abblaßt bis zum Farbenton der Kontrollprobe, um beim Abkühlen wiederzukehren. Man kann den Organextrakt nach *Pflüger* in folgender Weise von dieser das Jod bindenden Substanz reinigen: Man nimmt auf 10 cm^3 der unreinen Glykogenlösung, die man auf 3% KOH und 10% JK gebracht hat, 50 cm^3 Alkohol von 96%, filtriert durch ein schwedisches Filter, wäscht zuerst mit einer Mischung von 1 Volum wässeriger Lösung von 3%iger KOH und 10%igem JK, $^1/_2$ Volum Alkohol von 96%, darauf mit Alkohol von 60% mehrmals, endlich mit Alkohol von 97·8%. Nach Abfluß des Alkohols löst man mit Wasser, verjagt den Alkohol auf dem Wasserbade und neutralisiert die abgekühlte Lösung mit Essigsäure. Der das Jod bindende Körper ist jetzt verschwunden und die Glykogenlösung verhält sich so, wie es oben für die reine Glykogenlösung angegeben worden ist.

III. Darstellung.

Ich folge im folgenden der Darstellung von *Pflüger-Nerking*[1]), die die Herstellung eines vollkommen reinen Glykogens gewährleistet.

Um ein recht glykogenreiches Organ zu haben, empfiehlt es sich, die Leber von Hunden zu nehmen, welche nach *Schöndorff*[2]) auf Glykogen gemästet worden sind und bei denen die Trockensubstanz der Leber zu ungefähr $^2/_3$ aus Glykogen besteht. Die Glykogenmästung geschieht in der Weise, daß ein Hund von 6—8 *kg* Gewicht nach einer achttägigen Hungerperiode zunächst 3 Tage lang täglich 200 *g* Fleisch, 100 *g* Reis, 100 *g* Kartoffeln und dann während 4 Tagen außer diesem Futter noch 150—200 *g* Rohrzucker erhält. Das letzte Futter erhält er am Vorabend vor der am Morgen stattfindenden Tötung.

Die Leber wird in der Fleischmaschine zerkleinert und in einen mit siedendem Wasser gefüllten Kolben gebracht: 100 *g* Leber auf 200 cm^3 Wasser. Nach 5—6stündigem Erhitzen im kochenden Wasserbade wird abgekühlt und erst durch Glaswolle und dann durch Papier filtriert. Das

[1]) *E. Pflüger*, Das Glykogen. 2. Aufl. S. **29** (1905); *Nerking*, Über die elementare Zusammensetzung und das Invertierungsvermögen des Glykogens. *Pflügers* Archiv. Bd. **85**. S. 321 (1901).

[2]) *Schöndorff*, Über den Maximalwert des Gesamtglykogengehalts von Hunden. Ibidem. Bd. **99**. S. 201 (1903).

durchsichtige Filtrat wird nach *Pflüger-Nerking* behandelt, indem zu 800 *g* Lösung 80 *g* JK, 40 *cm*³ Kalilauge von 60%, 400 *cm*³ Alkohol von 96% zugesetzt werden. Nachdem das Glykogen sich abgesetzt hat, wird die klare Flüssigkeit abgesaugt, durch ein schwedisches Filter filtriert und das Glykogen mit folgender Lösung gewaschen: 1000 *cm*³ Wasser, 100 *g* JK, 50 *cm*³ Kalilauge von 60% und 500 *cm*³ Alkohol von 96%.

Das auf dem Filter befindliche Glykogen wird wieder in abgekochtem heißem Wasser gelöst und abermals mit JK, KOH und Alkohol in derselben Weise wie vorher gefällt und gereinigt. Dann wird das Präparat zur Beseitigung von JK und KOH in Wasser gelöst und mit 1 Volum 96%igem Alkohol gefällt, abfiltriert, mit 66%igem und 96%igem Alkohol gewaschen.

Das so erhaltene Präparat wird mit einer kleinen Menge Lauge von 30% KOH eine Stunde lang in einem Kolben auf dem kochenden Wasserbade erhitzt. Nach Abkühlung wird die Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und mit einem Volumen Alkohol von 96% gefällt. Nach der Filtration wird der Niederschlag gewaschen mit einer Lösung, bestehend aus 1 Volum KOH von 15% und einem Volum Alkohol von 96%; dann 2mal mit 66%igem, 96%igem und schließlich absolutem Alkohol und Äther gewaschen.

Jetzt werden 5—6 Fällungen mit einem oder zwei Volumen Alkohol vorgenommen, um das Präparat von KOH zu reinigen. Durch Zusatz von einigen Tropfen Phenolphtalein oder von Rosolsäure wird der abtropfende Alkohol auf die Abwesenheit von KOH geprüft.

Das Glykogen wird in Wasser gelöst und der Lösung eine kleine Menge Essigsäure zugesetzt, darauf wird mit 1 Volum 96%igem Alkohol gefällt, die Flüssigkeit abgesaugt, filtriert und das Glykogen mit Alkohol gewaschen. Diese Reinigung mit Essigsäure geschieht 3mal.

Zur Entfernung der Essigsäure wird das Glykogen 3—4mal mit Alkohol gefällt, zuletzt mit säurefreiem Alkohol. Weil das Glykogen mit zunehmender Reinheit immer schwieriger durch Alkohol gefällt wird, dürfen die wässerigen Lösungen nicht zu verdünnt sein. Das schneeweiße Präparat wird 2 Tage konstant mit absolutem Alkohol in folgender Weise gewaschen: Man verschließt das Abflußrohr des Trichters mit einem Gummischlauch und einer Klemme, gießt Alkohol auf das Glykogen und läßt denselben nach einigen Stunden abfließen. Ebenso wird das Glykogen mit Äther 3 Tage lang gewaschen. Es zerfällt dann auf dem Filter in Stücke. Es wird dann über Chlorcalcium oder Phosphorsäureanhydrid (nicht über Schwefelsäure) in einen Exsikkator gestellt, den man evakuiert. Konstantes Gewicht erzielt man durch 2tägiges Trocknen bei 100° C.

Neuerdings stellt *Pflüger* reine Glykogenlösung in folgender Weise dar[1]): Von dem durch Zerkleinerung in der Fleischhackmaschine gewonnenen Organbrei werden 500 *g* mit 500 *cm*³ 60%iger Kalilauge 3 Stunden lang

[1]) *W. Grebe,* Kritische Untersuchungen über die quantitative Analyse des Glykogens. *Pflügers* Archiv. Bd. **121**. S. 609 (1908).

im siedenden Wasserbade erhitzt. 1/4—1/2 Stunde nach Beginn des Erhitzens wird der Kolben herausgenommen und tüchtig umgeschüttelt, damit der Fleischbrei sich mit der Kalilauge gut vermischt. Nach dem Abkühlen wird auf 2 *l* aufgefüllt, gut gemischt und 4 *l* 96%iger Alkohol zugesetzt. Um eine bessere Ausscheidung des Glykogens zu bewirken, setzt man ca. 100 *cm*³ einer gesättigten Kochsalzlösung zu und läßt über Nacht stehen. Die klare Flüssigkeit wird vorsichtig abgegossen und der Glykogenniederschlag auf ein schwedisches Filter gebracht. Der Brei wird mehrere Male mit 60%igem Alkohol gewaschen, bis das Filtrat möglichst farblos ist. Dann wird mehrere Male mit Alkohol von 96%, dann ebenfalls mehrere Male mit Äther und schließlich wieder mit absolutem Alkohol gewaschen. Das auf dem Filter und in den Bechergläsern befindliche Glykogen wird dann mit heißem Wasser in Lösung gebracht. Um den noch vorhandenen Farbstoff ganz zu entfernen, werden zu je 150 *cm*³ Glykogenlösung 2 *cm*³ rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1·19 zugesetzt, dann mehrere Male durch schwedisches Filter filtriert und schließlich die Lösung neutralisiert. Dieselbe enthält jetzt reines Glykogen von schneeweißem Aussehen.

IV. Quantitative Analyse des Glykogens.

Nachdem *E. Pflüger* in den letzten Jahren durch umfangreiche Arbeiten die quantitative Glykogenanalyse sichergestellt hat, haben die alten Methoden der Analyse nur noch historische Bedeutung. Wer zuverlässig arbeiten will, darf sich daher nach der heutigen Sachlage nur der *Pflüger*schen Methode bedienen, welche darum auch allein hier mitgeteilt wird.[1])

1. Aufschließung, Fällung und Isolierung des Glykogens.

100 *g* des zu untersuchenden Organes, das zuvor in der Fleischhackmaschine zerkleinert worden ist, werden zusammen mit 100 *cm*³ Kalilauge von 60% (Kaliumhydrat Ia Merck) in ein Kölbchen aus böhmischem Glas gebracht, gut umgeschüttelt und im kochenden Wasserbad 3 Stunden lang erhitzt. Nach 1/4—1/2stündigem Erhitzen wird noch einmal gut umgeschüttelt, um eine gleichmäßige Mischung zu erhalten. Die Mündung des Kölbchens wird mit einem Uhrgläschen zugedeckt. Nach Ablauf der 3 Stunden läßt man abkühlen, bringt den Inhalt des Kölbchens in ein Becherglas, verdünnt mit dem gleichen Volumen Wasser (200 *cm*³), so daß die Lösung nun 15% KOH enthält. Ein Teil des zur Verdünnung genommenen Wassers dient dazu, das Kölbchen vollständig rein auszuspülen. Man fällt nun mit dem doppelten Volum Alkohol von 95%.

Man läßt den Niederschlag sich gut absetzen, weil dann die Filtration schneller vor sich geht, doch soll man nicht länger als 24 Stunden stehen lassen, weil sich sonst das Glykogen stärker mit Farbstoff inhibiert und schwerer durch Auswaschen zu reinigen ist.

[1]) *E. Pflüger,* Das Glykogen. 2. Aufl. S. 104 ff. 1905. — Derselbe, Eine neue Methode der Glykogenanalyse. *Pflügers* Archiv. Bd. 114. S. 242 ff. 1906.

Man gießt nun die klare, über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit vorsichtig ab, so daß das Glykogensediment am Boden bleibt, und filtriert die abgegossene Flüssigkeit durch ein schwedisches Filter von 15 *cm* Durchmesser. Wenn das Filter gut ist, so läuft die Lösung meist längere Zeit im Strahl ab. Ist das zu untersuchende Organ stark glykogenhaltig, so nimmt man nur einen Teil der alkalischen Glykogenlösung, oder man stellt mehrere Filtrierapparate auf. Immer suche man so zu arbeiten, daß so wenig wie möglich Substanz von dem Glykogensediment auf das Filter gelangt.

Nachdem die Flüssigkeit vom Sediment abgegossen ist, gießt man ein großes Volum Alkohol von 60% auf den Niederschlag, rührt mit einem Glasstab gut um und läßt wieder absitzen. Um dieses zu erleichtern, fügt man zweckmäßig einige Tropfen einer gesättigten Kochsalzlösung hinzu, weil dadurch das Glykogen körnig wird und sich besser abscheidet. Nachdem das Glykogen sich abgesetzt hat, dekantiert man wieder, und so im ganzen 3mal. Hierauf wiederholt man dasselbe Verfahren noch 2mal mit 96%igem Alkohol, 1mal mit absolutem Alkohol, 3mal mit Äther und zum Schluß mit absolutem Alkohol.

Ein Teil des Niederschlages ist jetzt auf dem Filter. Man nimmt das Filter vom Trichter, entfaltet es über dem Becherglas, welches das Glykogensediment enthält, und läßt den Glykogenklumpen hineinfallen. Man löst nun das Glykogen in heißem Wasser auf und spült ebenso mit heißem Wasser aus den Bechergläsern, welche die dekantierte Flüssigkeit enthielten, sowie von dem Filter und dem Trichter alles daran haftende Glykogen sorgfältigst in das Becherglas mit dem Glykogensediment. Man rührt mit einem Glasstabe bis alles Glykogen sich gelöst hat. Die wässerige Glykogenlösung sieht jetzt gewöhnlich etwas schmutzig aus.

Das weitere Verfahren richtet sich danach, ob das Glykogen durch Polarisation direkt oder nach Invertierung als Traubenzucker bestimmt werden soll.

Im ersteren Falle wird die schwach alkalische Glykogenlösung mit verdünnter Essigsäure schwach angesäuert; es entsteht ein allmählich sich verdichtender Niederschlag leicht bräunlicher Flocken. Man spült die Flüssigkeit ohne zu filtrieren in einen Maßkolben von passender Größe und füllt bis zur Marke auf. Man hat nun das Volum der Lösung, welche alles Glykogen enthält.

Man filtriert durch ein trockenes schwedisches Filter in einen anderen Kolben. Das Filtrat ist farblos, von leuchtender Opaleszenz, und auf dem Papier des Filters hinterbleibt ein gelblicher Hauch, der allen Farbstoff enthält. Das Filtrat ist zur Polarisation geeignet. Soll das Glykogen nach Invertierung als Traubenzucker bestimmt werden, so neutralisiert man die wässerige Glykogenlösung mit Salzsäure vom spez. Gew. 1·19 genau, die man tropfenweise zusetzt. Hierauf bringt man die neutralisierte Glykogenlösung durch einen Trichter unter mehrmaligem Ausspülen mit heißem Wasser in einen Kolben von 500 cm^3 Inhalt. Der im Kolben

befindlichen Lösung werden jetzt 25 *cm*³ Salzsäure vom spez. Gew. 1·19 zugesetzt. Weil später nach der Invertierung die Lösung in dem Kolben neutralisiert werden muß, darf derselbe nicht bis zur Marke gefüllt werden. Die in ihm enthaltene Lösung enthält nahezu 2·2% ClH.

Bei dem bisher beschriebenen Verfahren war von 100 *g* Organbrei ausgegangen worden. Hat man nicht soviel zur Verfügung, wenn z. B. das Glykogen in einem sehr kleinen Organ oder nur in einem Teil eines Organs bestimmt werden soll, so verfährt man folgendermaßen: Es handelte sich nur um 10 *g* Substanz. Man bringt dieselben in einem kleinen Kölbchen zusammen mit 10 *cm*³ KOH-Lauge von 60% in das kochende Wasserbad, erhitzt 3 Stunden und setzt nach Abkühlung 40 *cm*³ Wasser zu und fällt mit 160 *cm*³ Alkohol. Im übrigen bleibt das Verfahren dasselbe wie es oben beschrieben wurde, nur wird die zu invertierende Lösung später nicht auf 500, sondern nur auf 100 oder 200 *cm*³ gebracht. Auf je 100 *cm*³ der neutralisierten Glykogenlösung kommen 5 *cm*³ Salzsäure vom spez. Gew. 1·19.

2. Bestimmung des Glykogens.

a) Durch Polarisation. Die in der oben angegebenen Weise hergestellte Glykogenlösung ist zur Polarisation geeignet. Nach *Pflüger* hängt die Polarisierbarkeit nicht allein vom Prozentgehalt der Glykogenlösung ab, sondern auch von der Größe der Glykogenstäubchen. *Pflüger* benutzte zu seinen Bestimmungen einen Polarisationsapparat nach *Landolt* mit 3teiligem Polarisator nach *Lippich* mit geradsichtigem Spektroskop und einer Ablesung von 0·01°. Er macht besonders darauf aufmerksam, daß bei jeder Bestimmung mindestens 10 Einstellungen zu machen und daß die Angaben des Apparates mit Normalquarzplatten zu prüfen seien. Auch soll man beim Vorhandensein einer hinreichend konzentrierten Lösung zur Bestätigung des Drehwinkels noch eine halbe und Viertelkonzentration untersuchen. Die durch Polarisation erhaltenen Werte wurden kontrolliert durch Titration der invertierten Lösung nach *Fehling-Soxhlet*.

b) Durch Titration nach voraufgegangener Invertierung des Glykogens. Diese Bestimmung ist nach *Pflüger* die Methode, welche am sichersten und genauesten zum Ziele führt, besonders wenn es sich um die Feststellung kleiner Unterschiede in verschiedenen Organen oder in verschiedenen Teilen desselben Organes handelt.

Die 2·2% HCl enthaltende Glykogenlösung wird in ein kochendes Wasserbad gebracht und die Mündung des Kolbens mit einem Uhrschälchen zugedeckt. Nach 3stündigem Erhitzen läßt man abkühlen. Man bringt nun ein Stückchen Reagenzpapier hinein und läßt aus einer Bürette soviel 60%ige Kalilauge zufließen, daß die Lösung eben alkalisch wird. Man füllt dann bis zur Marke mit Wasser auf und filtriert durch ein Faltenfilter. Diese Lösung dient nun zur gravimetrischen Bestimmung des Zuckers nach *Pflüger* (siehe S. 174 ff.).

Um den Wert für Glykogen zu erhalten, multipliziert man den durch die gravimetrische Methode erhaltenen Wert mit 0·927.

Quantitative Zuckerbestimmung mit Hilfe der Kupfermethoden und spezielle Methoden zur Zuckerbestimmung in tierischen Flüssigkeiten.

Von **Karl Grube**, Bonn-Neuenahr.

I. Quantitative Zuckerbestimmung.

Das Prinzip der Zuckerbestimmung mit Hilfe der Kupfermethoden, d. h. der *Fehling*schen Lösung oder Modifikationen derselben, beruht auf der sog. *Trommer*schen Probe. Diese Probe besteht in der Reduktion einer alkalischen Kupferlösung zu Kupferoxydul bzw. Kupferoxydulhydrat durch Traubenzucker.

Fehling gab zuerst die genaue Vorschrift zur Herstellung der alkalischen Kupferlösung, wie er auch zuerst ein festes Reduktionsverhältnis zwischen Traubenzucker und Kupferoxyd aufstellte.

Eine vollständige Klarstellung der bei der Reduktion der alkalischen Kupferlösung durch Zucker stattfindenden Vorgänge gab jedoch erst *Soxhlet*.[1]) Dieser wies nach, daß jede der untersuchten Zuckerarten — Invertzucker, Traubenzucker, Milchzucker, Galaktose, Maltose — ein anderes Reduktionsvermögen für alkalische Kupferlösungen hat, und ferner, daß das Reduktionsverhältnis zwischen Kupfer und Zucker kein konstantes, sondern ein verschiedenes ist, abhängig *a)* von der Konzentration der aufeinander wirkenden Lösungen oder *b)* von der Menge des in der Lösung befindlichen Kupfers oder, was die Regel ist, daß beide unter *a)* und *b)* genannten Faktoren bestimmend auf das Reduktionsverhältnis einwirken.

Soxhlet stellt die bei den einzelnen Zuckerarten erhaltenen Hauptresultate in folgender Weise zusammen:

Traubenzucker: 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 105·2 *cm*³ *Fehling*scher Lösung unverdünnt, 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 101·1 *cm*³ *Fehling*scher Lösung + 4 Vol. Wasser. Reduktionsverhältnis = 1 : 10·52 — 1 : 10·11. Verdünnung der Kupfer- und Zuckerlösung erniedrigt, Kupferüberschuß erhöht das Reduktionsvermögen.

Invertzucker: 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 101·2 *cm*³ *Fehling*scher Lösung unverdünnt, 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 97·0 *cm*³ *Fehling*scher

[1]) *Soxhlet*, Das Verhalten der Zuckerarten zu alkalischen Kupferlösungen etc. Journ. f. prakt. Chemie. Neue Folge. Bd. **21**. S. 227 (1880).

Lösung + 4 Vol. Wasser. Reduktionsverhältnis = 1 : 10·12 — 1 : 9·70. Verdünnung der Kupfer- und Zuckerlösung erniedrigt. Kupferüberschuß erhöht das Reduktionsvermögen.

Milchzucker: 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 74·0 *cm*³ *Fehling*scher Lösung. Reduktionsverhältnis = 1 : 7·40. Verdünnung der Kupfer- und Zuckerlösung hat keinen oder doch einen nur unmerklichen Einfluß auf das Reduktionsvermögen. Kupferüberschuß erhöht das Reduktionsvermögen in viel geringerem Maße als beim Trauben- und Invertzucker.

Galaktose: 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 98 *cm*³ *Fehling*scher Lösung unverdünnt. 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 94 *cm*³ *Fehling*scher Lösung + 4 Vol. Wasser. Reduktionsverhältnis = 1 : 9·8 — 1 : 9·4. Verdünnung der Kupfer- und Zuckerlösung erniedrigt das Reduktionsvermögen der Galaktose in demselben Grade wie das des Trauben- und Invertzuckers. Kupferüberschuß erhöht das Reduktionsvermögen derselben in weit geringerem Maße wie das des Trauben- und Invertzuckers.

Lävulose: Für diese berechnen sich nach den für Invert- und Traubenzucker erhaltenen Zahlen: 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 97·2 *cm*³ *Fehling*scher Lösung unverdünnt, 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 93·0 *cm*³ *Fehling*scher Lösung + 4 Vol. Wasser. Reduktionsvermögen = 1 : 9·72 — 1 : 9·3. Verdünnung und Überschuß jedenfalls wie bei Trauben- und Invertzucker wirkend. Wahrscheinlich ist das Reduktionsvermögen der Lävulose dem der Galaktose gleich.

Maltose: 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 64·2 *cm*³ *Fehling*scher Lösung unverdünnt. 0·5 *g* in 1%iger Lösung = 67·5 *cm*³ *Fehling*scher Lösung + 4 Vol. Wasser. Reduktionsverhältnis = 1 : 6·09 — 1 : 6·41. Verdünnung der Zucker- und Kupferlösung erhöht das Reduktionsvermögen. Kupferüberschuß ist bei Anwendung unverdünnter *Fehling*scher Lösung ohne Einfluß auf das Reduktionsvermögen. Kupferüberschuß erhöht bei starker Verdünnung in geringem Maße das Reduktionsvermögen.

Soxhlet zeigte also die wichtige Tatsache, daß die seit *Fehling* geltende Annahme, daß 1 Äquivalent Zucker 10 Äquivalente Kupferoxyd reduziere, nicht begründet, sondern nur ein empirischer Titer für die *Fehling*sche Lösung sei, ferner, daß bei der Einwirkung einer Zuckerlösung auf *Fehling*sche Lösung beliebiger Konzentration die ersten Anteile am stärksten, die folgenden immer schwächer reduzieren, auch wenn man kalt mischt und dann erst erwärmt, daß also das Reduktionsverhältnis von der Konzentration abhänge und der gefundene Wert nur für die nämliche Konzentration gültig sei, bei der er bestimmt wurde.

Pflüger hat die *Soxhlet*schen Angaben neuerdings nachgeprüft.[1]) Er sagt über die Methode: „Die Titration soll strengstens nach den von *Soxhlet* gegebenen Vorschriften durchgeführt werden. Denn ich habe mich von der Klassizität derselben überzeugt.“

[1]) *E. Pflüger*, Eine neue Methode der Glykogenanalyse. *Pflügers* Arch. Bd. **114**. S. 242 (1906).

Maßanalytische Methode der Zuckerbestimmung nach Fehling-Soxhlet.

Man gebraucht zwei Lösungen.

Lösung I. Chemisch reines Kupfersulfat wird einmal aus verdünnter Salpetersäure, dreimal aus Wasser umkristallisiert, zwischen Fließpapier getrocknet und 12 Stunden lang an der Luft liegen gelassen. Davon werden 34·639 *g* in destilliertem Wasser aufgelöst und damit auf 500 cm^3 aufgefüllt.

Lösung II. 173 *g* Seignettesalz, das dreimal umkristallisiert ist, werden in 400 cm^3 Wasser gelöst und dazu 100 cm^3 Natronlauge hinzugefügt, welche im Liter 516 *g* Natriumhydrat enthält. Lösung II ist jedesmal frisch zu bereiten.

Ausführung:

a) Vorversuch. 25 cm^3 der Kupferlösung + 25 cm^3 der Seignettesalzlösung gemischt werden in einer Porzellanschale oder im *Erlenmeyer*schen Kölbchen zum Kochen erhitzt und von der Zuckerlösung portionsweise so lange hinzugegeben, bis die Flüssigkeit nach entsprechend langem Aufkochen nicht mehr blau erscheint. Da nach *Soxhlet* 50 cm^3 unverdünnter *Fehling*scher Lösung 23·75 cm^3 einer 1 $^0/_0$igen Traubenzuckerlösung reduzieren, so kann man aus der Menge der gebrauchten Zuckerlösung den ungefähren Gehalt berechnen. Man verdünnt nun die Zuckerlösung soweit, daß sie ca. 1 $^0/_0$ Zucker enthält.

b) Hauptversuch. Zu 50 cm^3 *Fehling*scher Lösung werden in der Kälte ca. 23 cm^3 der nahezu 1 $^0/_0$igen Zuckerlösung zugesetzt und so lange gekocht, als für die betreffende Zuckerart erforderlich ist (bei Traubenzucker, Invertzucker und Galaktose 2, bei Maltose 4, Milchzucker 6 Minuten); man gießt dann die ganze Flüssigkeit durch ein doppeltes Faltenfilter. Sobald 3—5 cm^3 der Flüssigkeit durch das Filter gegangen sind, säuert man mit Essigsäure an und versetzt mit Ferrocyankalium; dunkle Rotfärbung zeigt Anwesenheit größerer Kupfermengen, blasses Rosa Spuren von Kupfer an, verändert sich die Farbe nicht mehr, so ist alles Kupfer ausgefällt. War noch Kupfer in Lösung, so nimmt man zu einem neuen Versuch eine größere Menge der Zuckerlösung, war das Filtrat frei von Kupfer, so nimmt man 1 cm^3 Zuckerlösung weniger. Man stellt so viele Versuche an, bis bei 2 Bestimmungen nur um 0·1 cm^3 verschiedene Mengen Zuckerlösung angewendet wurden und von den Filtraten das eine kupferhaltig, das andere kupferfrei ist. Die zwischen diesen beiden Mengen liegende Quantität Zuckerlösung ist diejenige, welche gerade zur Zersetzung von 50 cm^3 *Fehling*scher Lösung notwendig ist.

Beispiel: 100 *g* Traubenzucker des Handels werden auf 250 cm^3 Lösung gebracht; von dieser Lösung waren im Vorversuch 8 cm^3 erforderlich, um in den 50 cm^3 *Fehling*scher Lösung die blaue Farbe zum Verschwinden zu bringen.

50 cm^3 *Fehling* = 23·75 oder rund 24 cm^3 1 $^0/_0$iger Traubenzuckerlösung, 8 cm^3 müßten also auf 24 cm^3 oder 83·3 cm^3 auf 250 cm^3 aufgefüllt werden, um eine Lösung von ca. 1 $^0/_0$ zu erhalten.

Von dieser Lösung werden zugesetzt zu 50 cm^3 *Fehling*

1. 23·0 cm^3: Filtrat blaugrün,
2. 24·0 „ : „ grünlich,
3. 25·0 „ : „ gelb, keine Kupferreaktion,
4. 24·5 „ : „ gelb, mit Essigsäure und Ferrocyankali dunkelrot,
5. 24·7 „ : „ gelb, „ „ „ „ rosarot.
6. 24·8 „ : „ gelb, keine Kupferreaktion.

Gebraucht demnach 24·75 cm^3 Zuckerlösung.

Da 50 cm^3 *Fehling* durch 23·75 cm^3 1%iger Traubenzuckerlösung zersetzt werden, so enthalten die 24·75 cm^3 der Zuckerlösung 0·2375 *g* Traubenzucker. 250 cm^3 = 83·3 cm^3 ursprünglicher Lösung enthalten 2·399 *g* Zucker; 250 cm^3 ursprünglicher Lösung (= 10 *g* käuflicher Traubenzucker) enthalten 7·2 *g*. Die 10 *g* des untersuchten Zuckers enthalten demnach 72% reinen Traubenzucker.

Handelt es sich um kleinere Zuckermengen, so nimmt man nur 20 cm^3 *Fehling*sche Lösung (je 10 cm^3 der Kupfer- und Seignettesalzlösung) und fügt 80 cm^3 Wasser hinzu. Im übrigen verfährt man wie angegeben. Der Titer für 20 cm^3 *Fehling* = 0·099 *g* Dextrose.

Ist die zu titrierende Flüssigkeit gefärbt, so kann es schwierig sein, mit der Ferrocyankaliprobe eine deutliche Reaktion zu bekommen. In solchen Fällen verfährt man in folgender Weise: Man kocht das Filtrat im Porzellantiegel oder *Erlenmeyer*schen Kölbchen mit einigen Tropfen der Zuckerlösung etwa eine Minute, läßt 3—4 Minuten stehen, gießt die Lösung ab und wischt nun den Boden des Gefäßes mittelst eines mit weichem Fließpapier umwickelten Glasstabes aus. War noch Kupfer in der Lösung, so ist dasselbe durch das Kochen mit Zuckerlösung als Kupferoxydul abgeschieden und färbt, da es sich während des Stehenlassens zu Boden gesenkt hat, das Filtrierpapier rot.

Titration nach Bang.[1])

Die Methode beruht darauf, daß sich Kupferoxydul bei Gegenwart von Rhodan als Kupferrhodanür ausscheidet, wenn die Lösung keine fixen Alkalien, sondern Karbonate enthält. Versetzt man daher eine Kupferkarbonat und Kaliumkarbonat enthaltende Lösung mit Rhodan, so scheidet sich bei der Reduktion weißes Kupferrhodanür aus, und zwar ist die Ausscheidung quantitativ.

Man verwendet nur soviel Zuckerlösung, daß nicht alles Kupferoxyd reduziert wird, daß die Flüssigkeit also blau bleibt, und titriert den Überschuß mit einer Hydroxylaminsulfatlösung. Das Ende der Reaktion zeigt sich in der Entfärbung der blauen Lösung.

Die Reduktion durch Hydroxylamin verläuft nach der Formel

$$4\,CuO + 2\,NH_3O = 2\,Cu_2O + N_2O + 3\,H_2O,$$

so daß 1 Mol. Kupferoxyd 1—2 Mol. Hydroxylamin entspricht.

[1]) Zur Methode der Zuckerbestimmung. Biochem. Zeitschr. Bd. 2. S. 271 (1906).

Damit von der Lösung von schwefelsaurem Hydroxylamin 1 *cm*³ genau 1 *cm*³ Kupferlösung entspreche, müssen 6·55 *g* des schwefelsauren Salzes zu 2 *l* Wasser gelöst werden.

Zwei Lösungen sind notwendig.

Lösung I:

Kupfersulfat, gereinigt nach *Soxhlet* (siehe S. 169)	12·5 *g*
Kaliumkarbonat	250·0 *g*
Rhodankalium	200·0 *g*
Kaliumbikarbonat	50·0 *g*
Destilliertes Wasser zu	1·0 *l*

Kaliumkarbonat, Kaliumbikarbonat und Rhodankalium werden zusammen unter Erwärmen in ca. 600 *cm*³ Wasser gelöst. Man läßt abkühlen und das in ca. 75 *cm*³ Wasser gelöste Kupfersulfat langsam zufließen. Die Kupfersulfatlösung muß kalt sein, weil sich sonst Kohlensäure entwickelt. Man füllt auf zu 1 *l* und filtriert nach 24 Stunden. Es ist zweckmäßig, sich gleich 2 *l* herzustellen.

Lösung II:

Hydroxylamin. sulfur.	6·55 *g*
Rhodankalium	200·00 *g*
Destilliertes Wasser zu	2·00 *l*

Ausführung:

Aus einer Bürette gibt man 10 *cm*³ der Zuckerlösung in ein 200 *cm*³-Kölbchen, fügt 50 *cm*³ Kupferlösung hinzu, erhitzt auf einem Drahtnetz zum Kochen und läßt 3 Minuten lang kochen. Man kühlt rasch auf Zimmertemperatur ab und stellt unter die mit Hydroxylamin gefüllte Bürette. Man titriert, bis die Flüssigkeit farblos ist.

Enthält die Zuckerlösung mehr als 60 *mg* Zucker in 10 *cm*³, so werden die 50 *cm*³ Kupferlösung vollkommen reduziert, man muß deshalb weniger als 10 *cm*³ verwenden.

Tabelle zur Berechnung der Zuckermenge.

Hydroxyl. *cm*	Zucker *mg*	Hydroxyl. *cm*	Zucker *mg*	Hydroxyl. *cm*	Zucker *mg*	Hydroxyl. *cm*	Zucker *mg*
43·85	5	29·60	19	17·75	33	7·65	47
42·75	6	28·65	20	16·95	34	7·05	48
41·65	7	27·75	21	16·15	35	6·50	49
40·60	8	26·85	22	15·35	36	5·90	50
39·50	9	26·00	23	14·60	37	5·35	51
38·40	10	25·10	24	13·80	38	4·75	52
37·40	11	24·20	25	13·05	39	4·20	53
36·40	12	23·40	26	12·30	40	3·60	54
35·40	13	22·60	27	11·50	41	3·05	55
34·40	14	21·75	28	10·90	42	2·60	56
33·40	15	21·00	29	10·20	43	2·15	57
32·45	16	20·15	30	9·50	44	1·65	58
31·50	17	19·35	31	8·80	45	1·20	59
30·55	18	18·55	32	8·20	46	0·75	60

Titration nach Pavy.[1])

Man gebraucht dazu zwei Lösungen.

Lösung I:

Kristallinisches Kupfersulfat	4·158 *g*
Destilliertes Wasser zu	500 cm^3

Lösung II:

Seignettesalz	20·4 *g*
Ätzkali	20·4 *g*
Konzentrierte Ammoniaklösung (spez. Gew. 0·88) .	300 cm^3
Destilliertes Wasser zu	500 cm^3

Man stellt jede Lösung für sich dar, braucht dieselben aber nicht getrennt aufzuheben, da sie auch zusammengegossen lange Zeit haltbar sind.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß das durch den Zucker reduzierte Kupferoxyd durch das in der Lösung enthaltene Ammoniak in Lösung gehalten wird. Bei Eintritt der Reduktion tritt daher eine Entfärbung der Lösung ein, und der Endpunkt der Reaktion ist dann erreicht, wenn die blaue Flüssigkeit gänzlich entfärbt ist.

Nach *H. M. Vernon*[2]) gibt man zweckmäßig der Lösung folgende Zusammensetzung:

Kristallinisches Kupfersulfat	4·158 *g*
Seignettesalz	40·8 *g*
Ätzkali	40·8 *g*
Ammoniaklösung (spez. Gew. 0·88) . .	600 cm^3
Destilliertes Wasser zu	1 *l*

10 cm^3 der Lösung entsprechen 0·005 *g* Dextrose.

Es ist wünschenswert, sich den Titer der Lösung von Zeit zu Zeit, mit Hilfe einer Zuckerlösung von bekannter Zusammensetzung zu bestimmen.

Ausführung. In ein ca. 150 cm^3 fassendes Kochfläschchen (s. Fig. 12), durch dessen Gummistopfen das Ausflußrohr der Bürette sowie ein gebogenes Glasrohr zum Entweichen der Luft und des Dampfes geht, werden 5—10 cm^3 der Kupfer-Seignettesalzlösung gebracht und mit 20—30 cm^3 destilliertem Wasser verdünnt. Die Bürette ist in 20 cm^3 eingeteilt und jedes Zentimeter in Zehntel. Das Ganze wird in einem Ständer fixiert. An Stelle des Quetschhahns verwendet *Pavy* eine Schraubenvorrichtung, welche den Abfluß der Flüssigkeit aus der Bürette gut zu regulieren gestattet.

Nachdem die Zuckerlösung in die Bürette gebracht und nach Entfernung etwaiger Luftblasen genau eingestellt ist, wird die Kochflasche

[1]) The Physiology of the Carbohydrates. p. 71. London 1894.

[2]) *H. M. Vernon*, The differences of action of various diastases. Journal of Physiology. Vol. 28. p. 156. 1902.

mit ihrem Inhalt mit der Bürette in Verbindung gebracht und über der Gasflamme vorsichtig zum Kochen erhitzt. Sobald die Flüssigkeit vollkommen am Kochen ist, läßt man aus der Bürette die Zuckerlösung zutropfen, und zwar so schnell, daß in der Minute 60—100 Tropfen abfließen. Gegen Ende der Reaktion läßt man etwas langsamer zulaufen, um ein Hinausgehen über den Endpunkt zu vermeiden. Ist dieser erreicht, so nimmt man die Flamme hinweg und liest an der Bürette die Menge der gebrauchten Flüssigkeit ab. Man macht 2—3 Bestimmungen, die höchstens um $^1/_2$—$^1/_{10}$ cm^3 differieren dürfen. Das Mittel davon ist der richtige Wert.

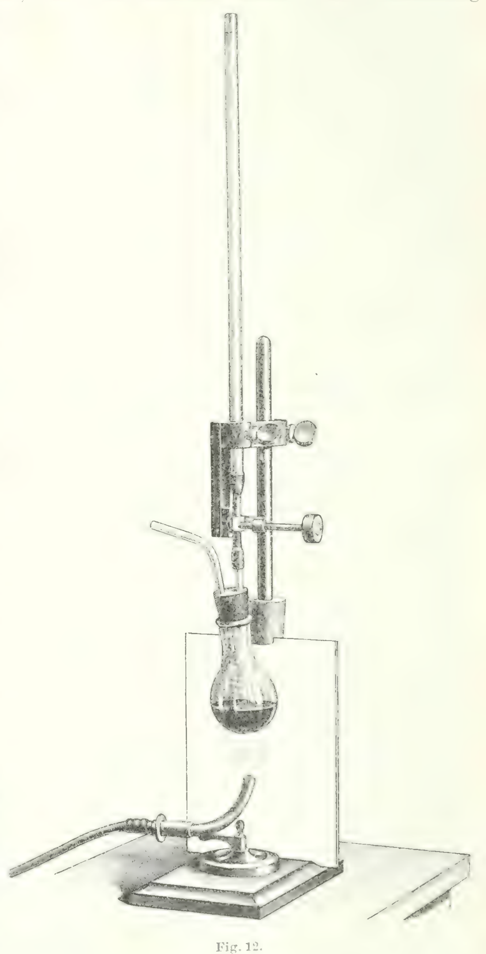


Fig. 12.

Die gebrauchte Zuckerlösung enthält die Menge Traubenzucker, welche der gebrauchten Kupfermenge entspricht, also 0·005 oder 0·0025 *g*, je nachdem man 10 oder 5 cm^3 Kupfer-Seignettesalzlösung verwendet hat.

Bei dem Verfahren ist folgendes zu beachten: Man darf nicht zu schnell aus der Bürette zulaufen lassen, da man sonst über den Endpunkt der Reaktion hinausgeht. Man darf aber andrerseits nicht zu langsam zulaufen lassen, da sonst das Ammoniak entweicht und das Oxydul nicht in Lösung bleibt. Ferner muß man dauernd im Kochen halten, da sonst Luft eintreten kann und dadurch eine Reoxydation des Oxyduls bewirkt würde.

Um gegen die Gefahr eines zu schnellen Entweichens des Ammoniaks geschützt zu sein, hat *Vernon* die oben mitgeteilte Lösung mit einem stärkeren Ammoniakgehalt empfohlen. Um den Endpunkt der Reaktion genau erkennen zu können, ist hinter der Kochflasche eine weiße Scheibe angebracht.

Bei stärker gefärbten Flüssigkeiten ist die Methode wegen der Schwierigkeit, den Endpunkt scharf zu erkennen, nicht anwendbar.

Die genauesten Werte enthält man, wenn man die Zuckerlösung so einstellt, daß 5—10 cm^3 derselben genügen, um vollständige Entfärbung herbeizuführen. Es entspricht das einem Zuckergehalt von 0·5—1·0 pro Tausend.

Durch einen Tastversuch orientiert man sich daher zunächst über die Konzentration der Zuckerlösung und verdünnt dieselbe entsprechend.

Die Berechnung ist sehr einfach. Um 10 cm^3 *Pavy*scher Lösung zu entfärben, gebraucht man 0·005 *g* Traubenzucker. Gesetzt, es wären gebraucht worden 7·5 cm^3 Zuckerlösung, so ist $7·5 : 0·005 = 100 : x$, $x = 0·066$; die Zuckerlösung war 5fach verdünnt worden, sie enthielt also $5 \times 0·066 = 0·33\%$ Zucker.

II. Die gravimetrische Methode der Zuckerbestimmung nach E. Pflüger.[1]

Diese Methode stellt eine Verbesserung der *Fehling-Allihn*schen Methode der gravimetrischen Zuckerbestimmung dar, einer Methode, die nach den Untersuchungen *Pflügers* verschiedene Übelstände hat, deren erster und wichtigster der ist, daß man bei ihr infolge von zu kurzer Kochzeit und infolge von Oxydulverlusten beim Filtrieren zu kleine Werte erhält. Man gebraucht 2 Lösungen, welche getrennt aufzubewahren sind.

Lösung I enthält in 500 cm^3 34·639 *g* Kupfersulfat mit 5 Molekülen Kristallwasser. Das Kupfersulfat wird 1mal aus Salpetersäure, 3mal aus Wasser auskristallisiert. Man läßt das durch gestörte Kristallisation erhaltene feine Mehl, nachdem es zwischen Fließpapier ausgepreßt wurde, auf Fließpapier ausgebreitet 24 Stunden an der Luft verdunsten.

Lösung II enthält in 500 cm^3 173 *g* Seignettesalz und 125 *g* KOH.

Das Seignettesalz ist 3mal aus Wasser umkristallisiert. Das KOH ist Marke Ia Merck. Die Lösung wird in der Weise bereitet, daß man in einem Becherglase 150 cm^3 Wasser zum Sieden erhitzt, vom Feuer entfernt und 173 *g* Seignettesalz hineinbringt und umrührt, bis Lösung erfolgt ist. Nach der Abkühlung gießt man die Lösung durch einen Trichter in einen 500 cm^3-Kolben und fügt 208 cm^3 Lauge von 60%iger KOH hinzu. Becherglas und Trichter werden vorsichtig ausgespült und das Spülwasser dem Kolben zugefügt. Nach vollkommener Abkühlung bringt man genau auf 500, gießt in ein Becherglas und filtriert durch dichte Glaswolle in den Kolben zurück.

[1]) Untersuchungen über die quantitative Analyse des Traubenzuckers. *Pflügers* Archiv. Bd. **69**. S. 399 (1898).

Die zu den Versuchen nötigen Asbestfilterröhrchen werden folgendermaßen hergestellt: Ein vertikal gedachtes Glasrohr von 10 *cm* Länge und 1·7 *cm* lichter Weite läuft nach unten in eine Verjüngung und darauf folgende birnenförmige Erweiterung von 1 *cm* äußerem Durchmesser aus. An diese Erweiterung schließt sich abermals nach einer Verjüngung das 6 *cm* lange Abflußrohr. Die kleine Birne enthält den Asbest, der die Gestalt und Form einer dicken Erbse hat. Die Füllung wird in folgender Weise hergestellt: Langfaseriger, weicher Asbest wird mehrere Tage in roter rauchender Salpetersäure gehalten, dann vielmals mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Wasser beim Umrühren des Asbestes keine Spur von Trübung mehr zeigt. Der Asbest wird getrocknet. Weiche langfaserige Stränge desselben werden nun auf einer Glasplatte mit Präpariernadeln in einzelne Fäden zerpflückt. Hat man eine größere Anzahl dieser Fäden beisammen, so schiebt man sie auf einen Haufen und bringt sie mit einer Pinzette in das weite Ende des Filtrierröhrchens. Mit einem etwas dickeren Draht drückt man die Fäden in die Birne hinein, ohne jedoch so fest zu drücken, daß die lockere Lagerung der Fasern verloren geht. Auf diese Weise wird die Birne mit Asbestfäden ganz ausgefüllt.

Um sich von der Güte der Asbestfilterröhrchen zu überzeugen, prüft man dieselben in folgender Weise: Man filtriert die heiße *Allihn*sche Lauge, nachdem sie mit kaltem Wasser auf die Hälfte verdünnt ist, an der Saugpumpe, wäscht mit 100 cm^3 Wasser, gießt Salpetersäure von 1·2 spezifischem Gewicht auf den Asbest und läßt langsam durchfiltrieren. Darauf wird der Asbest mit Wasser gewaschen und endlich mit verdünntem absoluten Alkohol und absolutem Äther. Nachdem das Röhrchen dann bei 100 cm^3 getrocknet ist, darf es an Gewicht nicht mehr als 0·2 bis 0·3 *mg* verloren haben.

Um sicher zu sein, daß die Röhrchen dicht sind, macht man stets gleichzeitig zwei identische Versuche. Beide Röhrchen müssen dann denselben oder nahezu denselben Wert ergeben.

Ausführung:

a) Vorversuch. 30 cm^3 *Allihn*sche Seignettesalzlösung werden aus einer Bürette in ein Becherglas von ca. 300 cm^3 Gehalt gemessen, dazu 30 cm^3 der Kupferlösung ebenfalls aus einer Bürette zugefügt; dazu 85 cm^3 der vorher genau neutralisierten und filtrierten Zuckerlösung. Das Gesamtvolum beträgt 145 cm^3. Man erhitzt auf einem Drahtnetz zum Kochen und kocht 2 Minuten. Dann gießt man 130 cm^3 Wasser hinzu und wartet, bis alles ausgeschiedene Kupferoxydul sich abgesetzt hat. Ist die Flüssigkeit noch blau, so kann der eigentliche Versuch vorgenommen werden, ist sie farblos, so nimmt man nur halb so viel Zuckerlösung zu einer 2. Probe, um festzustellen, ob ein Überschuß vorhanden ist.

Bei einiger Übung kann man auch einfacher so verfahren, daß man 5 cm^3 der neutralisierten Zuckerlösung nach *Worm-Müller* mit der gleichen Menge *Fehling*scher Lösung behandelt. Aus der Stärke der Reaktion kann man ersehen, ob man die ganzen 85 cm^3 Zuckerlösung zu der Bestimmung

braucht, oder ob man weniger verwenden soll. In letzterem Falle mißt man aus einer Bürette soviel Wasser zu, daß die Gesamtmenge wieder 145 cm^3 beträgt. Hat man also z. B. nur 50 cm^3 Zuckerlösung genommen, so muß man 35 cm^3 Wasser zufügen.

b) Hauptversuch. Man macht stets zwei identische Versuche nebeneinander. 2 Bechergläser aus bestem Jenaerglas werden je mit 30 cm^3 der *Allihn*schen Seignettesalzlösung, 30 cm^3 Kupfersulfatlösung, 85 cm^3 Zuckerlösung beschickt. Sie sind dann nahezu bis zur Hälfte gefüllt. Man mischt die Flüssigkeit durch mehrmaliges Umschwenken, deckt mit Uhrgläsern zu und bringt sie in ein Stativ, bestehend aus einem Retortenhalter mit 2 horizontalen Kupferringen, deren Lichtung so bemessen ist, daß die Bechergläser genau hineinpassen. Man taucht dann beide gleichzeitig in ein stark siedendes Wasserbad so tief, daß mehr als die untere Hälfte der Gläser vom Wasser umspült wird. Man läßt genau 30 Minuten kochen, hebt die Gläser gleichzeitig aus dem Wasser und gießt in jedes 130 cm^3 kaltes Wasser.

Während des Kochens hat man Zeit, die beiden Asbestfilterröhrchen genau abzuwiegen und auf den zugehörigen Saugflaschen anzubringen, welche durch Gummischläuche mit der Saugpumpe in Verbindung gebracht sind. Jede Saugflasche kann durch einen Glashahn der Wirkung der Pumpe entzogen werden. Über den Röhrchen ist in einem Stativ ein Trichter angebracht, durch den man die Röhrchen aus den Bechergläsern füllt. Erst wenn die Röhrchen gefüllt sind, setzt man die Pumpe in Gang und füllt immer frisch nach, wobei zweierlei zu beachten ist: einmal, daß die Röhrchen nie trocken laufen, da sie dann leicht undicht werden, und zweitens, daß man möglichst wenig Kupferoxydul aus dem Becherglase auf das Filter gelangen läßt.

Nachdem die blaue Flüssigkeit nahezu abfiltriert ist, gießt man 100 cm^3 Wasser in das Becherglas, wobei man sich des Kunstgriffes bedient, daß man das Wasser an einem Glasstabe, dessen unteres Ende gegen den Boden des Becherglases gestemmt ist, entlang laufen läßt; das Kupferoxydul bleibt dann ruhig am Boden liegen und über ihm steht das klare Wasser. Sind die 100 cm^3 ebenfalls durch die Röhrchen abfiltriert, so wird der Niederschlag von Kupferoxydul auf das Filter gebracht. Dies geschieht mit Hilfe einer Spritzflasche, welche mit zwei ca. $^1/_2$ *m* langen Gummischläuchen versehen ist, welche über die Enden der beiden Glasröhren der Spritzflasche gezogen sind. Der Gummischlauch, durch den das Wasser ausgespritzt wird, trägt eine in eine feine Spitze ausgezogene Glasröhre. Diesen Schlauch nimmt man in die rechte Hand und lenkt den Wasserstrahl gegen den Boden des mit der linken Hand umgekehrt über dem Trichter des Asbeströhrchens gehaltenen Becherglases. Das Ende des anderen Schlauches nimmt man in den Mund, um den notwendigen Druck hervorzubringen. Man spült nun sorgfältig das Kupferoxydul bis auf die letzten Stäubchen auf das Filter. Wenn das Wasser nahezu abfiltriert ist, läßt man 2mal absoluten Alkohol und 2mal Äther durchlaufen. Die Röhrchen werden

nun in den Trockenschrank gebracht und ca. eine halbe Stunde bei 100—120° C getrocknet. Nachdem sie dann im Exsikkator abgekühlt sind, sind sie fertig zum Wiegen.

Nachdem sie gewogen sind, befestigt man sie über zwei *Erlenmeyer*-schen Kölbchen, gießt starke Salpetersäure bis oben auf und deckt sie durch eine Glaskappe zu. Nachdem das Kupfernitrat abgelaufen ist, läßt man 3mal Wasser durchlaufen. Es ist dann alles Kupfer in den Kölbchen. Die Röhrchen werden dann an der Saugpumpe 2mal mit Wasser und je 2mal mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen, im Trockenschrank getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und gewogen. Sie müssen dann nahezu dasselbe Gewicht haben wie vor dem Versuch und sind für den folgenden Versuch fertig. Gut gestopfte Röhrchen können unbegrenzt lange Zeit gebraucht werden.

Die Gewichte des Kupferoxyduls in den beiden Röhrchen dürfen nach dem Versuch nicht mehr als 1 *mg* voneinander abweichen. Bei guten Röhrchen beträgt die Differenz in der Regel weniger.

Kontrolle der Methode.

Die soeben beschriebene gravimetrische Zuckerbestimmung nach *Pflüger* gibt, wenn sorgfältig ausgeführt, sehr genaue Werte. Es können aber zu hohe Werte dadurch zustande kommen, daß das angewandte Kali durch Tonerde oder Kieselsäure verunreinigt ist, oder daß die Eiweißkörper der untersuchten Organe nicht genügend zersetzt waren, und dadurch dem Kupferoxydul Verunreinigungen beigemengt sind. Für genaue Untersuchungen ist daher die Bestimmung des in dem gewogenen Kupferoxydul vorhandenen Kupfers notwendig.

Die Bestimmung desselben geschieht am besten nach der von *Volhard* angegebenen und von *Pflüger* nachgeprüften Methode[1], die im wesentlichen darin besteht, daß das in Lösung befindliche Kupfer bei Gegenwart von schwefliger Säure durch eine im Überschuß angewandte $\frac{1}{10}$-Normallösung von Rhodanammonium als Kupferrhodanür gefällt und im Filtrat hiervon der Überschuß des Rhodanammonium mit $\frac{1}{10}$-Normalsilberlösung bestimmt wird.

Die erste Bedingung für eine zuverlässige Analyse ist die genaueste Stellung der Silberlösung, weil diese auch zur Stellung der Rhodanammoniumlösung benutzt werden muß.

Zur Titration des Kupfers sind folgende Lösungen notwendig:

1. $\frac{1}{10}$-Normalsilberlösung,
2. $\frac{1}{10}$-Normalrhodanammoniumlösung,
3. kalt gesättigte Lösung schwefliger Säure in Wasser,
4. von salpetriger Säure freie Salpetersäure vom spez. Gew. 1·2.

---

[1]) *E. Pflüger,* Untersuchungen über die quantitative Analyse des Traubenzuckers. *Pflügers* Archiv. Bd. **69**. S. 423 (1898).

Ausführung: Die in dem *Erlenmeyer*schen Kölbchen aus dem Asbeströhrchen erhaltene Kupferlösung gießt man in eine kleine gläserne Kugelschale, berechnet, wieviel Kubikzentimeter Normalschwefelsäure zur Überführung des Nitrats in Sulfat nötig sind, fügt diese nebst einem kleinen Überschuß hinzu und dampft auf dem Wasserbad zur Trockne ab.

Die in der Glasschale enthaltenen blauen Kristalle werden in wenig Wasser gelöst und durch einen Trichter in einen geeichten 300 cm^3-Kolben übergeführt und Sodalösung zugegeben, bis Trübung eintritt. Dann füllt man die Glasschale mit 50 cm^3 der Lösung schwefliger Säure und gießt sie in den Kolben, wodurch die Kupferlösung wieder klar wird. Dann erhitzt man diese auf dem Drahtnetz über der Flamme und hält sie eine Minute am Kochen. Siedend heiß stellt man den 300 cm^3-Kolben unter die Bürette, welche das Rhodanammonium enthält, und läßt in einem Strahl ungefähr 5 cm^3 mehr ausfließen, als zur Fällung nötig ist. Man weiß ja nach der vorhergegangenen gravimetrischen Bestimmung, wieviel Kupfer höchstens vorhanden sein kann und 1 cm^3 Rhodanlösung = 6·36 *mg* Kupfer.

Nachdem die Flüssigkeit sich vollkommen abgekühlt hat, füllt man mit Wasser bis zur Marke auf, schüttelt gut um und filtriert durch ein trockenes schwedisches Filter. Das anfangs trübe Filtrat wird nochmals filtriert. Davon nimmt man 100 cm^3 in ein genau geeichtes Kölbchen, entleert dasselbe in ein Becherglas, füllt nochmals mit Wasser auf und entleert es wieder in dasselbe Becherglas. Man setzt 50 cm^3 Salpetersäure von spezifischem Gewicht 1·2 hinzu und 10 cm^3 einer gesättigten Lösung von Eisenammoniakalaun. Diese stark gerötete Flüssigkeit bringt man unter die Silbernitratbürette und läßt aus dieser unter Umschwenken der roten Flüssigkeit solange Silbernitrat hinzuträufeln, bis die rote Farbe verschwunden ist; dann fügt man noch bis zu 1 cm^3 hinzu, um eine runde Zahl zu bekommen. Nunmehr bringt man das Becherglas wieder unter die Rhodanbürette und läßt unter Umschwenken der Flüssigkeit solange Rhodan hinzutröpfeln, als die durch jeden Rhodantropfen bedingte rote Farbe noch verschwindet. Wenn die weiße Flüssigkeit einen deutlichen Stich ins Rote bekommen hat, ist die Reaktion abgelaufen. Man berechnet die vorhandene Kupfermenge nach folgender Formel:

$$\text{Kupfer} = (\text{Rh} + 3\,\rho - 3\,\sigma) = 6{\cdot}36,$$

wobei Rh die gesamte im Überschuß bei Beginn des Versuches zugesetzte Rhodanmenge, ρ die Menge Rhodanlösung und σ die Menge Silberlösung ist, welche für 100 cm^3 Filtrat gebraucht wurden.

Tabelle
der zusammengehörigen Werte für Zucker, Kupfer und Kupferoxydul nach *Pflüger*. Die Zahlen bedeuten Milligramme.

Zucker	Kupfer	Für 0·1 Zucker Kupfer	Kupferoxydul	Für 0·1 Zucker Kupferoxydul	Zucker	Kupfer	Für 0·1 Zucker Kupfer	Kupferoxydul	Für 0·1 Zucker Kupferoxydul
12	32·8	0·21064	36·8	0·23688	62	135·3	0·204	152·4	0·22976
13	34·9	0·21064	39·2	0·23688	63	137·3	0·204	154·7	0·22976
14	37·0	0·21064	41·6	0·23688	64	139·4	0·204	157·0	0·22976
15	39·1	0·21064	43·9	0·23688	65	141·4	0·204	159·3	0·22976
16	41·2	0·21064	46·3	0·23688	66	143·4	0·204	161·6	0·22976
17	43·3	0·21064	48·7	0·23688	67	145·5	0·204	163·9	0·22976
18	45·4	0·21064	51·0	0·23688	68	147·5	0·204	166·2	0·22976
19	47·5	0·21064	53·4	0·23688	69	149·6	0·204	168·5	0·22976
20	49·6	0·21064	55·8	0·23688	70	151·6	0·204	170·8	0·22976
21	51·7	0·21064	58·1	0·23688	71	153·6	0·204	173·0	0·22976
22	53·8	0·21064	60·5	0·23688	72	155·7	0·204	175·3	0·22976
23	55·9	0·21064	62·9	0·23688	73	157·7	0·204	177·6	0·22976
24	58·0	0·21064	65·2	0·23688	74	159·8	0·204	179·9	0·22976
25	60·1	0·21064	67·6	0·23688	75	161·8	0·204	182·2	0·22976
26	62·1	0·2028	69·9	0·2288	76	163·8	0·202	184·5	0·2272
27	64·2	0·2028	72·2	0·2288	77	165·8	0·202	186·7	0·2272
28	66·2	0·2028	74·5	0·2288	78	167·9	0·202	189·0	0·2272
29	68·2	0·2028	76·8	0·2288	79	169·9	0·202	191·3	0·2272
30	70·2	0·2028	79·1	0·2288	80	171·9	0·202	193·6	0·2272
31	72·3	0·2028	81·3	0·2288	81	173·9	0·202	195·8	0·2272
32	74·3	0·2028	83·6	0·2288	82	175·9	0·202	198·1	0·2272
33	76·3	0·2028	85·9	0·2288	83	178·0	0·202	200·4	0·2272
34	78·4	0·2028	88·2	0·2288	84	180·0	0·202	202·6	0·2272
35	80·4	0·2028	90·5	0·2288	85	182·0	0·202	204·9	0·2272
36	82·4	0·2028	92·8	0·2288	86	184·0	0·202	207·2	0·2272
37	84·4	0·2028	95·1	0·2288	87	186·0	0·202	209·5	0·2272
38	86·5	0·2028	97·4	0·2288	88	188·1	0·202	211·7	0·2272
39	88·5	0·2028	99·7	0·2288	89	190·1	0·202	214·0	0·2272
40	90·5	0·2028	101·9	0·2288	90	192·1	0·202	216·3	0·2272
41	92·6	0·2028	104·2	0·2288	91	194·1	0·202	218·6	0·2272
42	94·6	0·2028	106·5	0·2288	92	196·1	0·202	220·8	0·2272
43	96·6	0·2028	108·8	0·2288	93	198·2	0·202	223·1	0·2272
44	98·6	0·2028	111·1	0·2288	94	200·2	0·202	225·4	0·2272
45	100·7	0·2028	113·4	0·2288	95	202·2	0·202	227·6	0·2272
46	102·7	0·2028	115·7	0·2288	96	204·2	0·202	229·9	0·2272
47	104·7	0·2028	118·0	0·2288	97	206·2	0·202	232·2	0·2272
48	106·7	0·2028	120·2	0·2288	98	208·3	0·202	234·5	0·2272
49	108·8	0·2028	122·5	0·2288	99	210·3	0·202	236·7	0·2272
50	110·8	0·2028	124·8	0·2288	100	212·3	0·202	239·0	0·2272
51	112·8	0·204	127·1	0·22976	101	214·3	0·198	241·2	0·2232
52	114·9	0·204	129·4	0·22976	102	216·3	0·198	243·5	0·2232
53	116·9	0·204	131·7	0·22976	103	218·2	0·198	245·7	0·2232
54	119·0	0·204	134·0	0·22976	104	220·2	0·198	247·9	0·2232
55	121·0	0·204	136·3	0·22976	105	222·2	0·198	250·2	0·2232
56	123·0	0·204	138·6	0·22976	106	224·2	0·198	252·4	0·2232
57	125·1	0·204	140·9	0·22976	107	226·2	0·198	254·6	0·2232
58	127·1	0·204	143·2	0·22976	108	228·1	0·198	256·8	0·2232
59	129·2	0·204	145·5	0·22976	109	230·1	0·198	259·1	0·2232
60	131·2	0·204	147·8	0·22976	110	232·1	0·198	261·3	0·2232
61	133·2	0·204	150·1	0·22976	111	234·1	0·198	263·6	0·2232

(Fortsetzung der Tabelle.)

Zucker	Zucker	Für 0·1 Zucker Kupfer	Kupfer-oxydul	Für 0·1 Zucker Kupfer-oxydul	Zucker	Kupfer	Für 0·1 Zucker Kupfer	Kupfer-oxydul	Für 0·1 Zucker Kupfer-oxydul
112	236·1	0·198	265·8	0·2232	165	335·3	0·176	377·6	0·1986
113	238·0	0·198	268·0	0·2232	166	337·1	0·176	379·6	0·1986
114	240·0	0·198	270·2	0·2232	167	338·8	0·176	381·6	0·1986
115	242·0	0·198	272·5	0·2232	168	340·6	0·176	383·5	0·1986
116	244·0	0·198	274·7	0·2232	169	342·3	0·176	385·5	0·1986
117	246·0	0·198	276·9	0·2232	170	344·1	0·176	387·5	0·1986
118	248·0	0·198	279·2	0·2232	171	345·9	0·176	389·5	0·1986
119	250·0	0·198	281·4	0·2232	172	347·6	0·176	391·5	0·1986
120	252·0	0·198	283·6	0·2232	173	349·4	0·176	393·5	0·1986
121	253·9	0·198	285·9	0·2232	174	351·1	0·176	395·5	0·1986
122	355·9	0·198	288·1	0·2232	175	452·9	0·176	397·5	0·1986
123	257·8	0·198	290·3	0·2232	176	354·6	0·1664	399·3	0·1874
124	259·8	0·198	292·6	0·2232	177	356·2	0·1664	401·2	0·1874
125	261·8	0·197	294·8	0·2232	178	357·9	0·1664	403·1	0·1874
126	263·7	0·1884	296·9	0·212	179	359·6	0·1664	404·9	0·1874
127	265·6	0·1884	299·0	0·212	180	361·2	0·1664	406·8	0·1874
128	267·5	0·1884	301·2	0·212	181	362·9	0·1664	408·7	0·1874
129	269·3	0·1884	303·3	0·212	182	364·5	0·1664	410·6	0·1874
130	271·2	0·1884	305·4	0·212	183	366·2	0·1664	412·4	0·1874
131	273·1	0·1884	307·5	0·212	184	367·9	0·1664	414·3	0·1874
132	275·0	0·1884	309·6	0·212	185	369·5	0·1664	416·2	0·1874
133	276·9	0·1884	311·8	0·212	186	371·2	0·1664	418·1	0·1874
134	278·8	0·1884	313·9	0·212	187	372·9	0·1664	419·9	0·1874
135	280·6	0·1884	316·0	0·212	188	374·5	0·1664	421·8	0·1874
136	282·5	0·1884	318·1	0·212	189	376·2	0·1664	423·7	0·1874
137	284·4	0·1884	320·2	0·212	190	377·9	0·1664	425·6	0·1874
138	286·3	0·1884	322·4	0·212	191	379·5	0·1664	427·4	0·1874
139	288·2	0·1884	324·5	0·212	192	381·2	0·1664	429·3	0·1874
140	290·1	0·1884	326·6	0·212	193	382·9	0·1664	431·2	0·1874
141	291·9	0·1884	328·7	0·212	194	384·5	0·1664	433·1	0·1874
142	293·8	0·1884	330·8	0·212	195	386·2	0·1664	434·9	0·1874
143	295·7	0·1884	333·0	0·212	196	387·8	0·1664	436·8	0·1874
144	297·6	0·1884	335·1	0·212	197	389·5	0·1664	438·7	0·1874
145	299·5	0·1884	337·2	0·212	198	391·2	0·1664	440·6	0·1874
146	301·4	0·1884	339·3	0·212	199	392·8	0·1664	442·4	0·1874
147	303·2	0·1884	341·4	0·212	200	394·5	0·1664	444·3	0·1874
148	305·1	0·1884	343·6	0·212	201	396·1	0·1572	446·1	0·178
149	307·0	0·1884	345·7	0·212	202	397·6	0·1572	447·9	0·178
150	308·9	0·1884	347·8	0·212	203	399·2	0·1572	449·6	0·178
151	310·7	0·176	349·8	0·1986	204	400·8	0·1572	451·4	0·178
152	312·4	0·176	351·8	0·1986	205	402·4	0·1572	453·2	0·178
153	314·2	0·176	353·8	0·1986	206	403·9	0·1572	455·0	0·178
154	315·9	0·176	355·7	0·1986	207	405·5	0·1572	456·8	0·178
155	317·7	0·176	357·7	0·1986	208	407·1	0·1572	458·5	0·178
156	319·5	0·176	359·7	0·1986	209	408·6	0·1572	460·3	0·178
157	321·2	0·176	361·7	0·1986	210	410·2	0·1572	462·1	0·178
158	323·0	0·176	363·7	0·1986	211	411·8	0·1572	463·9	0·178
159	324·7	0·176	365·7	0·1986	212	413·4	0·1572	465·7	0·178
160	326·5	0·176	367·7	0·1986	213	414·9	0·1572	467·4	0·178
161	328·3	0·176	369·6	0·1186	214	416·5	0·1572	469·2	0·178
162	330·0	0·176	371·6	0·1986	215	418·1	0·1572	471·0	0·178
163	331·8	0·176	373·6	0·1986	216	419·7	0·1572	472·8	0·178
164	333·5	0·176	375.6	0·1986	217	421·2	0·1572	474·6	0·178

(Schluß der Tabelle.)

Zucker	Kupfer	Für 0·1 Zucker Kupfer	Kupferoxydul	Für 0·1 Zucker Kupferoxydul	Zucker	Kupfer	Für 0·1 Zucker Kupfer	Kupferoxydul	Für 0·1 Zucker Kupferoxydul
218	422·8	0·1572	476·3	0·178	235	448·4	0·146	505·2	0·1636
219	424·4	0·1572	478·1	0·178	236	449·9	0·146	506·8	0·1636
220	425·9	0·1572	479·9	0·178	237	451·3	0·146	508·4	0·1636
221	427·5	0·1572	481·7	0·178	238	452·8	0·146	510·1	0·1636
222	429·1	0·1572	483·5	0·178	239	454·2	0·146	511·7	0·1636
223	430·7	0·1572	485·2	0·178	240	455·7	0·146	513·3	0·1636
224	432·2	0·1572	487·0	0·178	241	457·2	0·146	515·0	0·1636
225	433·8	0·1572	488·8	0·178	242	458·6	0·146	516·6	0·1636
226	435·3	0·146	490·4	0·1636	243	460·1	0·146	518·2	0·1636
227	436·7	0·146	492·1	0·1636	244	461·5	0·146	519·9	0·1636
228	438·1	0·146	493·7	0·1636	245	463·0	0·146	521·5	0·1636
229	439·6	0·146	495·3	0·1636	246	464·5	0·146	523·6	0·1636
230	441·1	0·146	497·0	0·1636	247	465·9	0·146	524·8	0·1636
231	442·6	0·146	498·6	0·1636	248	467·4	0·146	526·4	0·1636
232	444·0	0·146	500·3	0·1636	249	468·8	0·146	528·1	0·1636
233	445·5	0·146	501·9	0·1636	250	470·3	0·146	529·7	0·1636
234	446·9	0·146	503·5	0·1636					

Titrimetrische Zuckerbestimmung nach Bertrand.[1]

Die Methode beruht darauf, daß das beim Kochen mit *Fehling*scher Lösung gebildete Kupferoxydul in einer Lösung von Ferrisulfat in Schwefelsäure gelöst und das gebildete Ferrosalz mit einer auf Ammoniumoxalat eingestellten Kaliumpermanganatlösung titriert wird.

Man gebraucht 4 Lösungen.

Lösung I:

Reines kristallinisches Kupfersulfat . . . 40 *g*
Destilliertes Wasser zu . . . . 1 *l*

Lösung II:

Reines Seignettesalz . . . . 200 *g*
Natriumhydroxyd in Stangen . . . . . 150 *g*
Destilliertes Wasser zu . . . . 1 *l*

Lösung III:

Ferrisulfat . . . . 50 *g*
Konzentrierte Schwefelsäure . . . . . 200 cm^3
Destilliertes Wasser zu . . . . 1 *l*

Lösung IV:

Kaliumpermanganat . . . . 5 *g*
Destilliertes Wasser zu . . . . 1 *l*

[1]) *Bertrand,* Le dosage des sucres réducteurs. Bullet. de la Société chimique. T. **35**. p. 1285 (1906). — *C. Funk,* Über den Wert der zur Bestimmung des Harnzuckers verwendbaren Methoden. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **56**. S. 507 (1908).

Man bestimmt den Titer der Kaliumpermanganatlösung in folgender Weise: 0·250 *g* Ammoniumoxalat werden im Becherglas mit 100 *cm*³ Wasser und 2 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure auf 60—80° C erwärmt. Man läßt aus einer Bürette von der Kaliumpermanganatlösung zulaufen, bis Rosafärbung eintritt.

Die Reaktion verläuft nach den Gleichungen

$$10 SO_4Fe + MnO_4K + 8 SO_4H_2 = 5[(SO_4)_3Fe_2] + SO_4K_2 + 2 SO_4Mn + 8 H_2O$$

und $5 C_2H_2O_4 + 2 MnO_4K + 3 SO_4H_2 = 10 CO_2 + 2 SO_4Mn + SO_4K_2 + 8 H_2O$.

Ein Molekül Oxalsäure, oder was dasselbe ist, ein Molekül Ammoniumoxalat, ist äquivalent 2 Fe, und diese sind nach der Gleichung

$$Cu_2O + (SO_4)_3Fe_2 + SO_4H_2 = 2 SO_4Cu + H_2O + 2 SO_4Fe$$

äquivalent 2 Cu.

Multipliziert man die Menge des verwandten Ammoniumoxalat (0·250 *g*) mit $\frac{63{\cdot}6 \times 2}{142{\cdot}1} = 0{\cdot}8951$, so erhält man die Kupfermenge, welche der bis zur Rosafärbung gebrauchten Kaliumpermanganatlösung entspricht.

Ausführung:

In ein Erlenmeyerkölbchen von ca. 150 *cm*³ bringt man 20 *cm*³ der zu untersuchenden Zuckerlösung und fügt dazu je 20 *cm*³ der Kupfer- und Seignettesalzlösung, erhitzt zum Kochen und läßt 3 Minuten lang vorsichtig kochen. Man nimmt von der Flamme und läßt das gebildete Kupferoxydul gut absitzen. Die Zuckerkupferlösung muß nach dem Kochen noch einen Überschuß an Kupfersulfat enthalten, d. h. blau gefärbt sein. Nachdem das Oxydul sich gut abgesetzt hat, bringt man die Flüssigkeit auf ein Asbestfilter — man kann dazu die Filterröhrchen von *Pflüger* oder von *Soxhlet* gebrauchen — und saugt ab. Es ist darauf zu achten, daß von dem Oxydulniederschlag möglichst wenig auf das Filter kommt. Nachdem die blaue Flüssigkeit abfiltriert ist, wird der Niederschlag mit destilliertem Wasser gewaschen und das Waschwasser aufs Filter gebracht. Man entfernt das Filter von der Saugflasche und wäscht diese mit destilliertem Wasser gut aus, so daß sie keine Spur von Kupfersulfat mehr enthält.

Man bringt nun zu dem Oxydulniederschlag im Kölbchen ca. 20 *cm*³ der Ferrisulfatlösung. Es bildet sich eine schön grüne Lösung. Diese wird auf das wieder auf der Saugflasche befestigte Filter gebracht und langsam durchgesaugt. Dabei geht das auf dem Filter befindliche Oxydul ebenfalls in Lösung. Ist noch nicht alles gelöst, so läßt man etwas mehr Ferrisulfatlösung durchlaufen. Kölbchen und Filter werden gut mit destilliertem Wasser gewaschen, um alles Kupfer in die Saugflasche zu bekommen. Man bringt diese nun unter die Bürette mit der Kaliumpermanganatlösung und titriert. Der Umschlag von Grün zu Rosa ist scharf und bei natürlichem und künstlichem Licht gut zu erkennen.

Beispiel: 20 *cm*³ einer Zuckerlösung von 0·118% (= 0·236 *g* Zucker) werden in der geschilderten Weise behandelt.

Es werden zur Titration gebraucht 5·27 *cm*³ Kaliumpermanganatlösung = 0·0472 *g* Kupfer = 0·0233 *g* Zucker.

Man erhält die besten Werte bei einer Konzentration der Zuckerlösung von unter 0·5%; stärkere Lösungen sind daher entsprechend zu verdünnen.

Tabelle zur Bestimmung der Zuckermenge (Glykose) aus dem Kupfer nach *Bertrand*.

Zucker in *mg*	Cu in *mg*	Zucker in *mg*	Cu in *mg*	Zucker in *mg*	Cu in *mg*	Zucker in *mg*	Cu in *mg*
10	20·4	33	64·6	56	105·8	79	144·5
11	22·4	34	66·5	57	107·6	80	146·1
12	24·3	35	68·3	58	109·3	81	147·7
13	26·3	36	70·1	59	111·1	82	149·3
14	28·3	37	72·0	60	112·8	83	150·9
15	30·2	38	73·8	61	114·5	84	152·5
16	32·2	39	75·7	62	116·2	85	154·0
17	34·2	40	77·5	63	117·9	86	155·6
18	36·2	41	79·3	64	119·6	87	157·2
19	38·1	42	81·1	65	121·3	88	158·8
20	40·1	43	82·9	66	123·0	89	160·4
21	42·0	44	84·7	67	124·7	90	162·0
22	43·9	45	86·4	68	126·4	91	163·6
23	45·8	46	88·2	69	128·1	92	165·2
24	47·7	47	90·0	70	129·8	93	166·7
25	49·6	48	91·8	71	131·4	94	168·3
26	51·5	49	93·6	72	133·1	95	169·9
27	53·4	50	95·4	73	134·7	96	171·4
28	55·3	51	97·1	74	136·3	97	173·1
29	57·2	52	98·9	75	137·9	98	174·6
30	59·1	53	100·6	76	139·6	99	176·2
31	60·9	54	102·3	77	141·2	100	177·8
32	62·8	55	104·1	78	142·8		

Spezielle Methoden der Zuckerbestimmung in tierischen Flüssigkeiten.

Die Schwierigkeit der Zuckerbestimmung in tierischen Flüssigkeiten besteht darin, daß dieselben neben dem Zucker noch Stoffe enthalten, welche dieselben Reaktionen geben wie dieser, so z. B. die Drehung des polarisierten Lichtes oder die Reduktion der alkalischen Kupferlösung. Ehe man daher den Zucker bestimmen kann, müssen diese Stoffe entfernt werden, was am besten durch Ausfällung geschieht. Hat man sich dann eine Lösung hergestellt, welche außer dem Zucker keine die Reaktionen desselben gebenden Substanzen mehr enthält, so kann man irgend eine der früher mitgeteilten Methoden der quantitativen Zuckerbestimmung zur Anwendung bringen.

I. Blut.

a) Entfernung der Stickstoffsubstanzen nach der Methode von *Patéin* und *Dufau* mit Merkurinitrat.[1])

[1]) *G. Patéin* und *Dufau,* De l'emploi du nitrate acide de mercure dans l'analyse des liquides sucrées. Journal de Pharmacie et de Chimie. 6. Série. T. 15. p. 221 (1902). —

Erforderlich sind zwei Lösungen.

Lösung I, Merkurinitratlösung.

Zu 220 *g* gelbes Quecksilberoxyd fügt man 300—400 cm^3 Wasser und allmählich unter Schütteln und Erwärmen die Menge von Salpetersäure, welche nötig ist, um dasselbe aufzulösen. Man füllt auf ein Liter auf und filtriert.

Lösung II, Natronlauge vom spez. Gew. 1·3 (37 %).

Ausführung: 50 cm^3 defibriniertes Blut werden mit der gleichen Menge destilliertem Wassers versetzt, wodurch das Blut lackfarben wird. Man fügt dazu unter stetem Umschütteln 40 cm^3 der Merkurinitratlösung, es bildet sich ein massiger Niederschlag sämtlicher stickstoffhaltiger Substanzen. Man läßt ca. 5 Minuten stehen und neutralisiert, indem man aus einer Bürette tropfenweise Natronlauge hinzufügt und füllt dann zu 150 cm^3 auf. Im Filtrat darf auf Zusatz von Natronlauge kein Niederschlag mehr entstehen. Man nimmt einen aliquoten Teil zur Zuckerbestimmung. Da das Filtrat einen Überschuß an Quecksilbersalz enthält, muß dasselbe erst entfernt werden. Man fällt dasselbe durch Schwefelwasserstoff und filtriert wieder. Den überschüssigen Schwefelwasserstoff entfernt man durch Durchleiten von Luft. Dann bestimmt man den Zucker durch Polarisation oder Titration.

b) Fällung der Eiweißkörper durch Sublimat und Salzsäure nach *Schenck.* [1])

Man gebraucht dazu 5%ige Sublimatlösung und 2%ige Salzsäurelösung.

Ausführung: 50 cm^3 defibriniertes oder in Fluornatrium aufgefangenes Blut werden mit Wasser auf 100 cm^3 gebracht und zuerst 100 cm^3 2%iger Salzsäure und dann 100 cm^3 5%iger Sublimatlösung zugesetzt. Die Abmessung muß genau im Maßkolben geschehen. Man filtriert, leitet durch das Filtrat Schwefelwasserstoff. Nach 10 Minuten ist alles Quecksilber ausgefällt. Man filtriert wieder und mißt von dem Filtrat eine aliquote Menge ab, aus der der überschüssige Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft mit der Wasserstrahlpumpe entfernt wird. Man polarisiert und bestimmt den Zucker durch Polarisation oder durch Titration.

c) Fällung der Eiweißkörper nach *Bang.* [2])

Die Methode benutzt die von *Abeles* angegebene Ausfällung der Eiweißkörper mit einer alkoholischen Lösung von Zinkacetat. Anstatt des umständlichen Filtrierens, Auspressens, Auswaschens und Wiederfiltrierens verwendet *Bang* die Zentrifuge, um die zuckerhaltige Flüssigkeit von dem Niederschlag zu trennen.

Ausführung: Ein Zentrifugenröhrchen von ca. 200 cm^3 Inhalt wird mit 100 cm^3 Alkohol und 2·5 *g* Zinkacetat gefüllt und gewogen. Man

---

Bierry und *Portier*, Sur le dosage du sucre du sang. Compt. rend. de la Biolog. 15. Nov. 1902.

[1]) *F. Schenck*, Über Bestimmung und Umsetzung des Blutzuckers. *Pflügers* Archiv. Bd. 55. S. 203 (1894).

[2]) Über die Verwendung der Zentrifuge in der quantitativen Analyse. Festschrift für *O. Hammarsten* (1906). N. II.

läßt dann ca. 50 *cm*³ Blut aus der Ader einfließen und wiegt wieder. Mit einem Glasstabe werden die Blutkoagula zerteilt, bis der anfangs hellrote Niederschlag eine gleichmäßig schwarzgraue Masse bildet. Der Glasstab wird mit Alkohol abgespült und das Röhrchen damit aufgefüllt. Man zentrifugiert eine Stunde und gießt die Flüssigkeit in ein Becherglas ab, zerreibt den Rückstand mit 100 *cm*³ Alkohol und zentrifugiert wieder eine Stunde. Die Flüssigkeit wird in das Becherglas abgegossen und der Rückstand zum dritten Male mit 50 *cm*³ Alkohol gerührt und noch eine Stunde zentrifugiert. Die vereinigten Flüssigkeiten werden mit einer konzentrierten Sodalösung schwach alkalisch gemacht und von dem Niederschlag abfiltriert und ausgewaschen. Man säuert das Filtrat mit Essigsäure schwach an, konzentriert stark im Wasserbade, fügt einige Tropfen Zinkacetatlösung und nachher Sodalösung hinzu, filtriert und kann die Lösung polarimetrisch oder durch Titration bestimmen.

II. Harn. Die quantitative Zuckerbestimmung im Harn wird ausgeführt durch die Polarisation, die Gärung oder die Titration. Im allgemeinen soll man sich nicht mit der Anwendung einer dieser Methoden begnügen, sondern man soll den Harnzucker stets auf doppelte Weise bestimmen.

1. Bestimmung des Traubenzuckers.

a) Polarisation. Der zu untersuchende Harn muß klar und wenig gefärbt sein, er muß neutral oder sauer reagieren, er muß frei von Eiweiß sein. Hat er diese Eigenschaften nicht, so behandelt man ihn mit Bleizucker (Plumbum aceticum).

50 *cm*³ sauer reagierender Harn werden mit 10 *cm*³ Bleizuckerlösung und einigen Tropfen Essigsäure versetzt und filtriert. 30 *cm*³ des Filtrates = 25 *cm*³ Harn werden im 50 *cm*³ Kölbchen mit 5 *cm*³ gesättigter Natriumphosphatlösung gemischt, man füllt mit Wasser auf bis zur Marke und schüttelt gut um. Die klare Flüssigkeit wird polarisiert. Die abgelesene Drehung muß verdoppelt werden.

Behandlung mit Merkurinitrat.

50 *cm*³ Harn werden mit Quecksilbernitratlösung (deren Herstellung siehe S. 184) versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Aus einer Bürette fügt man tropfenweise Natronlauge zu, bis zur neutralen Reaktion, füllt auf und filtriert. Die klare Flüssigkeit kann polarisiert werden.

Um festzustellen, daß es sich um Traubenzucker handelt, vergärt man den Harn und bestimmt die Drehung vor und nach der Gärung. Die Drehung muß nach der Gärung verschwunden sein. Ist nach der Gärung Linksdrehung vorhanden, so kann es sich um Eiweiß, Glukuronsäure und Oxybuttersäure handeln.

Eiweiß sollte vor der Polarisation entfernt werden durch Kochen mit einem Zusatz von wenig Essigsäure.

Glukuron- und Oxybuttersäure vergären nicht, die gefundene Linksdrehung ist daher zu der Rechtsdrehung zu addieren, um den Wert für den Traubenzucker zu erhalten.

Enthält der Harn neben Traubenzucker auch die linksdrehende Lävulose, so muß auch titriert werden, die Titration gibt dann einen höheren Wert als die Polarisation.

Rechtsdrehung kann auch durch Medikamente bedingt sein, z. B. durch Morphium: in diesem Falle verschwindet sie durch die Gärung nicht

b) Gärung. Der in einer Lösung enthaltene Traubenzucker wird durch Hefe in Äthylalkohol und Kohlensäure gespalten. 1 cm^3 einer 1%igen Traubenzuckerlösung liefert ungefähr 2·5 cm^3 Kohlensäure bei 15° C und einem Barometerstand von 760 *mm*.

Die Gärungsprobe gilt als die zuverlässigste quantitative Zuckerbestimmung, doch sind für den Harn einige Einschränkungen zu machen. So ist die Methode nach *Pflüger*[1]) unbrauchbar zum Nachweis kleiner Zuckermengen und nach demselben Autor[2]) gibt es auch Harne, welche keinen Zucker enthalten und trotzdem so große Mengen von Kohlensäure bei der Vergärung mit Hefe entwickeln, daß dadurch das Vorhandensein von mehr als 1% Zucker vorgetäuscht werde.

Was die Ausführung anlangt, so kann man die für die Methode angegebenen Apparate benutzen, von denen die von *Lohnstein* und *Fleischer* angegebenen die zuverlässigsten sind.

Was die Dauer der Vergärung anlangt, so hat *C. Victorow* in dem *Pflüger*schen Laboratorium an diabetischen Harnen gezeigt[3]), daß die Gärung bei einer Temperatur von 34° C nach 6 Stunden vollkommen beendet ist, daß dagegen bei Zimmertemperatur die Dauer zwischen 10 und 36 Stunden schwankt. Es ist deshalb zweckmäßig, die Gärung bei 34° auszuführen.

c) Titration. Zur quantitativen Bestimmung des Zuckers kann man die früher angegebenen Methoden verwenden, nachdem der Harn vorher durch Merkurinitrat in der angegebenen Weise behandelt worden ist. Dadurch werden sämtliche die Reaktion störenden Substanzen ausgefällt.

Außer Traubenzucker kommen im Harn an reduzierenden Substanzen noch vor: einige Kohlehydrate, wie Isomaltose, dextrinartige Körper und das sogenannte tierische Gummi; ferner einige reduzierende Glukuronsäureverbindungen, und endlich reduzieren die Harnsäure und das Kreatinin.

Handelt es sich um Harne mit einem größeren Zuckergehalt, so kann die geringe durch die genannten Stoffe hervorgerufene Reduktion in der Regel vernachlässigt werden; handelt es sich dagegen um geringe Traubenzuckermengen und um die Entscheidung, ob überhaupt schon pathologische Verhältnisse vorliegen, so kann die Schwierigkeit recht erheblich sein. Man kann sich im letzteren Falle in der Weise helfen, daß man die Reduktion vor und nach der Vergärung feststellt.

---

[1]) *E. Pflüger*, Über den Einfluß chirurgischer Eingriffe auf den Stoffwechsel der Kohlenhydrate. *Pflügers* Archiv. Bd. **105**. S. 139 (1904).

[2]) *E. Pflüger*, ibid. Bd. **105**. S. 147.

[3]) Über die erforderliche Zeitdauer der Gärung beim Nachweis des Traubenzuckers im Harn. *Pflügers* Archiv. Bd. **118**. S. 583 (1907).

Zur Bestimmung kleinster Zuckermengen im Harn hat *Schöndorff* die Methode von *Patein* und *Dufau* zur Eiweißfällung benutzt. Er verfährt folgendermaßen[1]): Man bestimmt vorher durch einen Tastversuch mit Hilfe des von *Pflüger* und *Boland* angegebenen[2]) Tastverfahrens die Menge von Merkurinitrat, welche notwendig ist, um den Harn vollständig zu fällen. Man setzt zu dem Zweck die Quecksilberlösung allmählich zum Harn und prüft von Zeit zu Zeit mit Natriumbikarbonatbrei auf den Index. Wenn eine herausgenommene Probe, mit dem Brei verrieben, gelb bleibt, so ist genügend Merkurinitrat zugesetzt.

Man setzt zu dem zu untersuchenden Harn etwas mehr Merkurinitrat als man gefunden hat, neutralisiert unter beständigem Umrühren mit Natronlauge bis zur schwachsauren Reaktion. Wegen des geringen Zuckergehaltes werden mehrere Liter Harn in Arbeit genommen. Es wird vom Niederschlag abgenutscht, der Niederschlag 4—5mal mit verdünnter Merkurinitratlösung (100 cm^3 Lösung auf 1 l verdünnt) gewaschen. Eine entstehende Trübung wird durch Zusatz von ein paar Tropfen Salpetersäure gelöst.

Alle Filtrate werden vereinigt, mit Essigsäure angesäuert und Schwefelwasserstoff durchgeleitet. Vom abgeschiedenen Schwefelquecksilber wird abgesaugt, dasselbe mehrere Male mit destilliertem Wasser gewaschen und der überschüssige Schwefelwasserstoff durch einen starken Luftstrom verjagt. Das Filtrat wird mit Natronlauge alkalisch gemacht, mit Essigsäure wieder stark angesäuert und auf dem Wasserbade unter fortwährendem Ersatz der verdampften Essigsäure bis zu einem kleinen Volum eingedampft. Es muß dafür Sorge getragen werden, daß die Reaktion stets stark sauer bleibt.

Die heiße Flüssigkeit wird unter Umrühren in das 10fache Volum 96%igen Alkohols gegossen und bis zum nächsten Tage an einem kalten Orte stehen gelassen. Von den ausgeschiedenen Salzen wird abgesaugt, und dieselben werden mehrere Male mit Alkohol gewaschen. Der Alkohol wird auf dem Wasserbade verjagt, der Rückstand in wenig heißes Wasser aufgenommen und quantitativ in einen Maßkolben gespült. Es wird mit Natronlauge neutralisiert und nach dem Erkalten bis zur Marke aufgefüllt. Von einem entstandenen Niederschlage wird abfiltriert.

In dieser Lösung wird der Zucker nach *Fehling-Soxhlet* titriert, indem die Lösung mit dem gleichen Volum einer 1%igen Traubenzuckerlösung vermischt wird. Die Differenz der durch Titrieren gefundenen und der zugesetzten Zuckermenge gibt den Zuckergehalt der ursprünglichen Lösung an, den man auf die ursprüngliche Harnmenge umrechnet.

---

[1]) Untersuchungen über die Ausscheidung von Zucker im Harn von gesunden Menschen, nebst einer Methode der quantitativen Bestimmung kleinster Zuckermengen im Harn. *Pflügers* Archiv. Bd. **121**. S. 573 (1908).

[2]) Über eine Methode, den Stickstoffgehalt des menschlichen Harnes schnell annäherungsweise zu bestimmen. *Pflügers* Archiv. Bd. **38**. S. 573 (1886).

2. Bestimmung der Lävulose.

Enthält der Harn nur die linksdrehende Lävulose, so läßt sich deren Menge durch Polarisation bestimmen, doch ist zu bemerken, daß die Drehung der Lävulose keine konstante ist, sondern abhängt von der Temperatur und Konzentration.[1]) Durch Vergärung läßt sich entscheiden, ob es sich um Linksdrehung durch Lävulose oder durch andere Stoffe handelt. Im ersteren Falle verschwindet die Drehung nach der Gärung.

Chemisch prüft man auf Lävulose durch die *Seliwanoff*sche Reaktion. Zu diesem Zweck werden 10 cm^3 Harn mit etwas Resorzin und 2 cm^3 verdünnter Salzsäure erwärmt; bei Anwesenheit von Lävulose tritt Rotfärbung ein.

Enthält der Harn sowohl Dextrose wie Lävulose, so muß neben der Polarisation noch die Titration ausgeführt werden.

3. Bestimmung von Milchzucker.

Laktose kommt im menschlichen und tierischen Harn nur bei Wöchnerinnen bei Milchstauung[2]), nach der innerlichen Aufnahme sehr großer Mengen und nach der subkutanen Injektion vor.[3]) Der Milchzucker dreht das polarisierte Licht nach rechts und reduziert alkalische Kupferlösung. Er bildet mit Phenylhydrazin ein bei 200° schmelzendes Osazon.

Hat man in einem Harne durch Kochen mit alkalischer Kupferlösung das Vorhandensein von Zucker festgestellt, so kann man sich zur Entscheidung der Frage, ob es sich um Trauben- oder Milchzucker handelt, der Probe von *G. Buchner* bedienen. Zu dem Zwecke bringt man in einem Reagenzglase zu 10 cm^3 Harn 3 Tropfen Ammoniaklösung (spezifisches Gewicht 0·96) und setzt dazu 4—5 Tropfen Bleizuckerlösung. Man erhitzt im Wasserbade. Bei Anwesenheit von Glykose färbt sich der anfangs weiße Niederschlag fleischfarbig bis ockergelb, bei Anwesenheit von Milchzucker bleibt der Niederschlag rein weiß.

Mit Sicherheit weist man den Milchzucker dadurch nach, daß man ihn rein darstellt, was bei der leichten Auskristallisierbarkeit nicht so schwer ist. Nach *Hofmeister* verfährt man folgendermaßen:

500—1000 cm^3 Harn werden mit neutralem Bleiacetat versetzt, bis keine Fällung mehr erfolgt. Der Niederschlag wird abfiltriert und ausgewaschen. Das Filtrat wird, mit Bleiacetat und Ammoniak versetzt, einige Stunden stehen gelassen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und das Filtrat auf Rechtsdrehung und Reduktion geprüft. Wenn diese positiv, wird nochmals mit Bleiacetat und Ammoniak gefällt. Die Niederschläge werden in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff behandelt, welcher durch Durchleiten eines Luftstroms entfernt wird. Die Flüssigkeit wird mit frisch gefälltem Silberoxyd geschüttelt und filtriert. Das Filtrat wird zur Beseitigung des Silbers wieder mit Schwefelwasserstoff

---

[1]) *v. Lippmann,* Die Chemie der Zuckerarten. Bd. I. S. 823 (1904).

[2]) *F. Hofmeister,* Über Laktosurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 1. S. 101 (1877).

[3]) *F. Voit,* Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Zuckerarten im menschlichen Organismus nach subkutaner Injektion. Deutsches Archiv f. klin. Med. Bd. 58. S. 523 (1897).

behandelt, abermals filtriert und nach Zusatz von kohlensaurem Baryt zur Bindung etwa vorhandener Essigsäure so weit eingedampft, daß ein sirupartiger Rückstand bleibt. Der Rückstand wird mit soviel 90%igem Alkohol behandelt, bis ein flockiger Niederschlag entsteht. Es wird abfiltriert und aus dem alkoholischen Filtrat scheiden sich im Exsikkator Kristalle ab, die durch Umkristallisieren, Entfärben mit Tierkohle oder durch Extraktion mit kochendem 60—70%igen Alkohol gereinigt werden.

Mit dem reinen Milchzucker stellt man dann die entsprechenden Proben an.

III. Milch.

1. Bestimmung des Milchzuckers nach *Patéin.*[1])

50 *cm*³ Milch werden unter Umschütteln mit 10 *cm*³ Merkurinitratlösung (siehe S. 184) versetzt und auf 100 *cm*³ mit Wasser aufgefüllt und filtriert.

Das Filtrat wird mit Natronlauge vom spezifischen Gewicht 1·3 bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und der Zucker nach *Fehling-Soxhlet* durch Titration bestimmt. Es ist zu bemerken, daß man nach *Soxhlet* den Milchzucker 6 Minuten mit der alkalischen Kupferlösung kochen muß. Im übrigen verfährt man wie für den Traubenzucker angegeben.

2. Bestimmung nach *Soxhlet.*[2])

25 *cm*³ Milch werden mit 400 *cm*³ Wasser verdünnt, mit 10 *cm*³ der zur Zuckerbestimmung benutzten *Fehling*schen Lösung (69·28 *g* Kupfersulfat im Liter) und hierauf mit 6·5—7·5 *cm*³ einer Kalilauge versetzt, die so gestellt ist, daß ein Volum derselben das Kupfer aus einem Volum der Kupferlösung gerade herausfällt. Nach dem Zusatz der Lauge muß die Flüssigkeit noch sauer reagieren und darf etwas Kupfer gelöst enthalten. Man füllt auf 50 *cm*³ und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter.

100 *cm*³ der Lösung werden mit 50 *cm*³ *Fehling*scher Lösung im Becherglase vermischt und zugedeckt über doppeltem Drahtnetz zum Kochen gebracht. Man kocht 6 Minuten und filtriert durch ein Asbestfilter, reduziert das Kupfer im Wasserstoffstrom und berechnet nach der von *Soxhlet* aufgestellten Tabelle:

Kupfer *mg*	Milchzucker *mg*
392·7	300
363·6	275
333·0	250
300·8	225
269·6	200
237·5	175
204·0	150
171·4	125
138·3	100

[1]) Dosage du Lactose dans le lait. Journal de Pharmacie et de Chimie. 6. série. T. 15. S. 505 (1902).

[2]) Das Verhalten der Zuckerarten zu alkalischen Kupfer- und Quecksilberlösungen. Journal für prakt. Chemie. Neue Folge. Bd. 21. S. 267 (1880).

Spaltung razemischer Monosaccharide und der Polysaccharide in die Monosaccharide durch biologische Methoden.

Von **Hans Pringsheim**, Berlin.

1. Spaltung razemischer Monosaccharide durch Hefe.

Unter den bisher mit Sicherheit bekannten Monosacchariden sind nur die durch ihre sterische Konfiguration nahe verwandten, die d-Glukose, d-Mannose und d-Fruktose, leicht, die diesen etwas ferner stehende d-Galaktose weniger leicht durch Hefe vergärbar.[1]) Auf Grund dieser Eigenschaft gelingt es, die ihnen zugehörigen razemischen Formen zu spalten, d. h. aus den inaktiven synthetischen Substanzen durch Vergärung mittelst Hefe die d-Modifikationen wegzunehmen und die in der Natur nicht vorkommenden l-Antipoden, an deren Vergärung die Hefe nicht angepaßt ist, zu gewinnen. So kann man aus der d-l-Glukose die l-Glukose[2]), aus der d-l-Mannose die l-Mannose[3]), aus der d-l-Fruktose die l-Fruktose[4]) und aus der d-l-Galaktose die l-Galaktose[5]) erhalten.

Die Methode der Spaltung. Zur Vergärung der razemischen Monosaccharide bringt man die Zucker in 10%iger wässeriger Lösung mit frisch gewaschener, gutwirkender Bierhefe zusammen. Am besten verwendet man zu diesem Zwecke eine Reinkultur-Preßhefe. Da aber die große Menge der vorhandenen Hefezellen, wie auch das baldige Auftreten von Alkohol, die Entwicklung anderer Mikroorganismen hemmt, kann man auch mit gewöhnlicher Preßhefe auskommen. Mit Ausnahme der Vergärung der

---

[1]) Vgl. *Emil Fischer*, Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **26**. S. 60 (1898/99); auch *E. Abderhalden*, Lehrbuch der physiologischen Chemie. II. Aufl. S. 623. Urban & Schwarzenberg. Berlin-Wien. 1908.

[2]) *E. Fischer*, Über die optischen Isomeren des Traubenzuckers der Glukonsäure und der Zuckersäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. S. 2611 (1890).

[3]) *E. Fischer*, Synthese der Mannose und Lävulose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. S. 370 (1890).

[4]) *E. Fischer*, ibidem. S. 389.

[5]) *E. Fischer* und *J. Hertz*, Reduktion der Schleimsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **25**. S. 1247 (1892).

Galaktose ist die nach kurzer Zeit einsetzende Kohlensäureentwicklung nach 24 Stunden beendet; bei Galaktose setzt die Gärung erst nach 1—2 Stunden ein und dauert dann bis zum 5.—6. Tage fort.

Die Isolierung der l-Modifikation ist nur bei der Galaktose beschrieben worden.[1]) Hier wird die vergorene Lösung filtriert, zur völligen Reinigung mit etwas Tierkohle gekocht, abermals filtriert und zum Sirup eingedampft. Der letztere scheidet im Laufe von 12—15 Stunden den größten Teil der l-Galaktose in kleinen Kristallen ab. Das Produkt wird durch Absaugen von dem braunen Sirup getrennt, sorgfältig mit Methylalkohol gewaschen und in verdünnter wässeriger Lösung bis zur Entfärbung mit reiner Tierkohle behandelt. Beim Verdampfen der Lösung bleibt ein farbloser Sirup, der sehr bald kristallinisch erstarrt.

Um den mit Methylalkohol verriebenen und filtrierten Zucker aschefrei zu erhalten, löst man ihn durch längeres Kochen in viel absolutem Alkohol. Wird diese Lösung bis zur beginnenden Trübung eingedampft und dann abgekühlt, so scheidet sich ein Teil der unorganischen Beimengungen als flockiger Niederschlag aus und aus dem Filtrat kristallisiert bei längerem Stehen der Zucker in farblosen harten Krusten. Um die letzten Spuren von Asche zu entfernen, muß die Kristallisation aus Alkohol mehrmals wiederholt werden. Die Substanz zeigt dann den Schmelzpunkt von 162 bis 163° (unkorr.).

Die l-Glukose kann man im Anschluß an die Isolierung des auf chemischem Wege erhaltenen Produktes[2]) aus dem nach dem Verdampfen der vergorenen Lösung der d-l-Glukose erhaltenen Syrup durch Stehenlassen kristallinisch erhalten.

Es wird zuerst auf Ton abgepreßt und nach dem Umkristallisieren aus sehr wenig Wasser durch Pressen auf Ton nochmals von der Mutterlauge befreit; löst man die Substanz dann in heißem Methylalkohol und fügt zu der stark konzentrierten Flüssigkeit absoluten Alkohol, so beginnt nach längerer Zeit die Kristallisation der reinen wasserfreien l-Glukose in Gestalt harter prismatischer Kristalle, die meist zu Warzen verwachsen sind und bei 141—143° ohne Zersetzung schmelzen.[3])

Die l-Mannose und l-Fruktose sind bisher noch nicht in ganz reinem Zustand erhalten worden.

Zum Nachweis der Zucker kann man sich ihres Verhaltens gegen Phenylhydrazin bedienen. Zur Entfernung der Proteine tut man gut, in 5%iger Lösung von Natriumacetat aufzukochen und abzufiltrieren. Die so vorbereitete Lösung kann man dann gleich mit Phenylhydrazinchlorhydrat versetzen. l-Glukose und l-Fruktose geben in der Kälte mit einem Molekül Phenylhydrazin keine Hydrazone. Dagegen fällt bei beiden in der Wärme

---

[1]) *E. Fischer*, l. c. und Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente. S. 471. Berlin bei Julius Springer. 1908.

[2]) *E. Fischer*, l. c. und Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente. S. 370.

[3]) *E. Fischer*, l. c. und Untersuchungen. S. 333.

mit zwei Molekülen Phenylhydrazin l-Phenylglukosazon, das sich gegen 195° dunkel färbt und bei 205° unter Gasentwicklung schmilzt. — Für die l-Mannose ist das bei Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin zur wässerigen Lösung in der Kälte in feinen Kristallen auffallende l-Mannosephenylhydrazon, welches nach dem Umkristallisieren aus den 40fachen Mengen heißen Wassers bei raschem Erhitzen gegen 195° unter Gasentwicklung schmilzt, charakteristisch. Das ebenso darzustellende, in kaltem Wasser ziemlich schwer lösliche l-Galaktosephenylhydrazon schmilzt bei 158—160°. Das optische Drehungsvermögen dieser Körper kann zur weiteren Charakterisierung verwandt werden.[1])

2. Spaltung der Polysaccharide in Monosaccharide.

Die bisher bekannten, natürlich vorkommenden, vergärbaren Polysaccharide geben bei der hydrolytischen Spaltung nur solche optische Komponenten der Monosaccharide, die von Hefe vergoren werden; es bleibt also bei der Vergärung dieser Polysaccharide kein optisch konträrer Rest, so daß die Spaltung der natürlichen Polysaccharide durch gärende Hefe nicht in Betracht kommt. Anders kann das werden, falls die Polysaccharide der Synthese mit Hilfe rein chemischer Mittel zugänglich werden sollten; aus den so gewonnenen razemischen Produkten ließe sich dann durch Vergärung mittelst Hefe eine Spaltung in die optisch-aktiven Komponenten bewirken. Dabei bleibt fürs erste unentschieden, ob in solchen Fällen die optischen Komponenten der natürlichen Polysaccharide als solche oder deren hydrolytische durch Hefe unvergärbaren Spaltungsprodukte erhalten werden würden, da wir nicht wissen, wie sich die Enzyme der Hefe gegen inaktive Polysaccharide verhalten.

Der Vergärung der Polysaccharide geht immer eine Spaltung in die Monosaccharide voraus.[2]) Man kann nun die in der Hefe enthaltenen, Polysaccharide spaltenden Enzyme zur Zerlegung dieser in ihre hydrolytischen Abbauprodukte benutzen, wenn man die Enzyme aus der Hefe auszieht und so hydrolytisch wirksame, für die Gärung dagegen unwirksame oder nur schwach wirksame Extrakte verwendet. An Stelle von Hefeextrakten kann man sich auch solcher von anderen Mikroorganismen, von Gerstenmalz, oder tierischer Sekrete und Organe bedienen. Bei der Hefe, bei der die Verhältnisse am genauesten erforscht sind, kann das Resultat der Polysaccharidspaltung nun durch die Art der Herstellung des Extraktes beeinflußt werden. Während z. B. das Rohrzucker spaltende Enzym, die Hefeinvertase, schon in den wässerigen Auszug feuchter Hefe übergeht, wird die die Maltose hydrolysierende Hefemaltase, die wir nach den neueren Anschauungen als Endoenzym bezeichnen würden, von der lebenden

[1]) *E. Fischer*, l. c. und Untersuchungen. S. 349.

[2]) Vgl. hierzu *E. Fischer*, Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **26**. S. 60 (1898). — Untersuchungen S. 126.

Zelle nicht abgegeben. *Emil Fischer,* dem wir diese Untersuchungen verdanken, hat die Hefe daher durch Zusatz von Chloroform getötet[1]) oder die Zellen durch Zerreiben mit Glaspulver geöffnet.[2])

Wirklich verläßliche Resultate über diese Spaltungsergebnisse können nur gewonnen werden, wenn die Spaltungsprodukte in der im Abschnitt I *a)* beschriebenen Weise mit Phenylhydrazin nachgewiesen werden. Bisher sind auf enzymatischem Wege acht Disaccharide und zwei Trisaccharide gespalten worden, die dabei wie folgt zerfallen: Rohrzucker in d-Glukose und d-Fruktose, Maltose, Isomaltose, Gentibiose, Cellobiose und Trehalose in d-Glukose. Milchzucker und Melibiose in d-Glukose und d-Galaktose. Die Trisaccharide können unter dem Einfluß der Enzyme in verschiedener Weise gespalten werden. So zerfällt die Raffinose oder Melitriose durch Hefeenzyme in Melibiose und d-Fruktose[3]), während Emulsin sie in Rohrzucker und d-Galaktose spaltet.[4]) Hefe und Invertin zerlegen die Gentianose in Gentibiose und d-Fruktose, Aspergillus niger dagegen in die drei Monosaccharide.[5])

Auf Grund dieser biologischen Spaltungen kann die Gentibiose aus der Gentianose dadurch dargestellt werden, daß aus ihrer mit Hefe versetzten Lösung die d-Fruktose vergoren wird, während die ungespaltene Gentibiose zurückbleibt. Ebenso läßt die Obergärhefe die aus der Raffinose abgespaltene Melibiose ungespalten zurück, während die d-Fruktose der Wirkung des Gärenzyms verfällt.[6])

Die so gewonnenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die dort gegebenen Resultate wurden durch die Prüfung verschiedener Hefearten bestätigt und erweitert, wobei auch Torula, Kahmhefe, orangerote Hefe und Anomalushefe in den Kreis der Untersuchung gezogen wurden.[7]) Über die mit tierischen Sekreten und Organen ausgeführten Polysaccharidspaltungen ist das Original nachzulesen.[8])

Zur Spaltung wendet man die Polysaccharide in 10⁰/₀iger Lösung an. Die Menge der zuzusetzenden Enzymlösung braucht nur gering zu sein:

---

[1]) *E. Fischer,* Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. I. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **27**. S. 2985 (1894).

[2]) *E. Fischer,* Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. II. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **27**. S. 3479 (1894).

[3]) *A. Kalanthar,* Über die Spaltung von Polysacchariden durch verschiedene Hefeenzyme. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **26**. S. 88 (1898).

[4]) *C. Neuberg,* Zur Kenntnis der Raffinose. Abbau der Raffinose zu Rohrzucker und d-Galaktose. Biochem. Zeitschr. Bd. **3**. S. 519 (1907).

[5]) *Bourquelot,* Sur la physiologie du gentianose; son dédoublement par les ferments solubles. Compt. rend. de l'Academie des sciences. T. **126**. p. 1045 (1898).

[6]) *Loiseau,* Beitrag zum Studium der Melibiose. Zeitschr. des Vereins der Deutschen Zuckerindustrie. Bd. **53**. S. 1050 (1903).

[7]) *Kalanthar,* l. c.

[8]) *E. Fischer* und *W. Michel,* Über das Verhalten der Polysaccharide gegen einige tierische Sekrete und Organe. Sitzungsberichte der königlich preußischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 1896. V. 73.

Enzymatische Hydrolyse der Polysaccharide.[1]

	Rohrzucker	Maltose	Isomaltose[2]	Milchzucker	Trehalose	Melibiose	Cellobiose	Gentibiose[3]	Melitriose	Gentianose
Bierhefe	.	.	—	.	.	.	.	.	.	+
Frohberg-Hefe	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Wässeriger Auszug	+	—	.	—	—	.	.	.	.	.
Auszug aus getöteter Hefe	+	+	.	—	.	.	.	.	.	.
Hefeaufschwemmung	.	.	.	.	schwach	.	.	.	.	.
Unterhefe (Frohberg, Saaz)	.	.	.	.	.	+		.	.	.
Oberhefe (Frohberg, Saaz)	.	.	.	.	.	—	.	—	.	.
Milchzuckerhefe	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Wässeriger Auszug	—	.	.	—	.	.	.	.	.	.
Auszug aus getöteter Hefe	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.
Wässeriger Auszug aus Kefirkörnern	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.
Saccharomyces Marxianus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Wässeriger Auszug	+	—	.	.	.	.	.	.	.	.
Saccharomyces octosporus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Wässeriger Auszug	—	+	.	.	.	.	.	.	.	.
Monilia candida	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Wässeriger Auszug	—	+	.	.	.	.	.	.	.	.
Mit Glaspulver zerrieben	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.
Verschiedene Hefen[4]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Wässeriger Auszug	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.
Malzdiastase	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.
Invertin Merck	+	—	.	.	.	.	.	.	.	.
Emulsin Merck		—	+	+	.	.	+	+	+	.

+ bedeutet Hydrolyse, — bedeutet keine Hydrolyse.

[1]) Wenn nicht anders angegeben nach *E. Fischer*, Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. I. II. III. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **27**. S. 2985 und 3479 (1894); Jg. 28. S. 1429 (1895). — *E. Fischer* und *P. Lindner*, Über die Enzyme von Schizosaccharomyces octosporus und Sacch. Marxianus. Ibid. Jg. **28**. S. 984 (1895) und: Über die Enzyme einiger Hefen. Ibid. Jg. 28. S. 3034 (1895).

[2]) *E. F. Armstrong*, Studien über Enzymwirkung. Die synthetische Wirkung von Säuren verglichen mit derjenigen der Enzyme. Synthese von Maltose und Isomaltose. Proc. Royal Soc. London. Jg. **76**. (Serie B.) S. 592 (1905).

[3]) *Bourquelot* et *Hérissey*, Action des ferments solubles et de la lêvure haute sur le gentiobiose. Remarques sur la constitution du gentianose. Compt. rend. de l'Academie des sciences. T. **135**. p. 399 (1902).

[4]) *A. Kalanthar*, l. c.

wenige oder auch 1 *cm*³ genügen. Durch Zusatz von 0·2% Toluol hindert man die Entwicklung unabgetöteter Zellen oder die von Fremdorganismen. Man inkuliert bei 37° C. Da nach eigenen Beobachtungen die Spaltung nach 24 Stunden häufig noch nicht zum Abschluß gekommen ist, muß man mindestens 48 Stunden stehen lassen.

Darstellung eines wässerigen Hefeauszuges. Zur Herstellung eines wässerigen Hefeauszuges bedient man sich frisch gewaschener Hefe, die mit dem fünffachen Gewicht an Wasser etwa 24 Stunden bei 37° C im Brutraum stehen gelassen und dann filtriert wird.

An Stelle der durch Chloroformzusatz oder Zerreiben mit Glaspulver zu isolierenden Endoenzyme wird man sich jetzt eines nach dem Verfahren von *E. Buchner* hergestellten Preßsaftes bedienen, den man in so geringer Menge anwendet, daß er nur schwache, die Isolierung der Spaltungsprodukte nicht inhibierende, Gärwirkung entfaltet. Nach eigenen Erfahrungen kann man die Herstellung solcher Preßsäfte zur Polysaccharidspaltung auch auf Schimmelpilze übertragen, die man sich auf steriler Nährlösung in der genügenden Zahl von Erlenmeyerkolben selbst züchtet. Die *Buchner*sche Methode sei hier beschrieben.

Anhang.

Herstellung von Pilzpreßsäften nach Buchner.[1])

A. Hefepreßsaft.

Die Darstellung des Hefepreßsaftes wurde ursprünglich zur Einrichtung der zellfreien Gärung angegeben. Bekanntlich gelingt es ohne die Zertrümmerung der Zelle nicht, der Hefe die Zymase durch Wasserextraktion zu entziehen, da dieses Enzym im Zellsaft festgehalten wird. Das Zerreißen der Zellen ist also die theoretisch wichtige Grundlage der Preßsaftdarstellung; die Trennung des Zellsaftes von den Membranen ist nur experimentelles Beiwerk, das allerdings für das Gelingen der hervorzurufenden emzymatischen Wirkungen von großer Bedeutung ist. Wichtig ist vor allem, daß sich die Operation in verhältnismäßig kurzer Zeit durchführen läßt, so daß die sich vermischenden Enzyme nicht genügend Zeit haben, um sich gegenseitig zu vernichten. Vor allem unterliegt bekanntlich die Zymase der Wirkung der proteolytischen Enzyme des Preßsaftes. In allen Fällen muß man auch hier die Entwicklung von Fremdorganismen durch einen Zusatz von 0·2% Toluol hemmen, wenn man den Saft im Brutzimmer zur Wirkung bringt. Größere Gaben von Toluol sind zu vermeiden, da sie die Enzyme zu stark hemmen.

[1]) *E. Buchner, H. Buchner* und *M. Hahn*, Die Zymasegärung. Untersuchungen über den Inhalt der Hefezellen und die biologische Seite des Gärungsproblems. R. Oldenbourg, München und Berlin 1903.

Die Darstellung des Preßsaftes zerfällt in vier Operationen:

1. Das Waschen der Hefe.

2. Das Zerreiben der Hefe mit Quarzsand, wobei die Zellen geöffnet werden.

3. Das Verreiben der mit Quarzsand zerriebenen Hefe mit Kieselgur. Hierbei saugt die Kieselgur vermöge ihrer großen Oberfläche und ihrer kapillaren Struktur den Zellsaft auf.

4. Durch Pressen der so entstandenen plastischen Masse in der hydraulischen Presse unter Druck bis zu 300 Atmosphären wird der Saft in geklärter und durch die Kieselgur filtrierter Form abgegeben, während die Zellmembranen zurückbleiben.

1. Das Waschen der Hefe. Die aus der Brauerei zu beziehende Hefe wird zuerst durch ein Haarsieb mittelst aufgeschwemmten Wassers in ein hohes Gefäß gespült. Hier läßt man absitzen, hebert das Waschwasser ab und wiederholt die Operation, bis das Wasser klar und farblos abfließt (zwei- bis dreimal). Dann filtriert man die Hefe durch ein Koliertuch. Um die gewaschene Hefe möglichst zu entwässern, faltet man das Koliertuch beutelförmig, schlägt noch in ein baumwollenes, nicht appretiertes Preßtuch (Segeltuch) ein und unterwirft in der hydraulischen Presse einem schließlich fünf Minuten lang anhaltenden Druck von 50 Atmosphären. So erhält man einen Hefekuchen von etwa 70% Wassergehalt.

2. Das Zerreiben der Hefe mit Quarzsand. In einer großen Porzellanschale, die innen unglasiert sein muß, mengt man die Hefe in Portionen von 300—400 *g* mit dem gleichen Gewicht an Quarzsand, der durch ein Sieb von 200 Maschen auf 1 cm^2 hindurchgegangen ist. Dann beginnt man mit Hilfe eines schweren Pistills, das, wenn möglich, vermittelst einer Eisenstange in einer Führung beweglich ist, zu zerreiben. Die Dauer dieser Operation kann nur durch die Übung ermessen werden; mit Hilfe des Mikroskops gelingt es jedoch leicht festzustellen, wann die Hauptmenge der Hefezellen aufgesprengt ist. Für 200—300 *g* entwässerter Hefe genügen etwa 3—4 Minuten. Von der Vollkommenheit der Zertrümmerung der Zellen hängt die Ausbeute an Preßsaft hauptsächlich ab.

3. Das Verreiben mit Kieselgur. Jetzt setzt man der Hefe in größeren Portionen, deren Abmessung sich nach der Größe der Reibschale richtet, den vierten bis dritten Teil des Gewichtes an Kieselgur zu und verreibt von neuem, bis die Masse ein homogenes Aussehen von graubrauner Farbe angenommen hat und nicht mehr brüchig, sondern plastisch erscheint.

4. Das Auspressen des Saftes. Zum Zwecke des Auspressens wird die teigförmige Masse wieder in ein vorher angefeuchtetes, jedoch bei 50 Atmosphären Druck entwässertes, Preßtuch eingeschlagen und unter sich langsam um je 50 Atmosphären steigerndem Druck, der bis zu 300 Atmosphären erhöht wird, ausgepreßt. Der abfließende Preßsaft tropft auf ein Faltenfilter und fließt von diesem in das Sammelgefäß. Die abgepreßte

Hefe kann man nochmals zerreiben und von neuem bei 300 Atmosphären pressen. Man gewinnt so auf 1 *kg* entwässerte Hefe 450—500 cm^3 Preßsaft.

B. Pilzpreßsäfte in geringer Menge.

Muß man sich die Pilze, aus denen man den Preßsaft gewinnen will, erst durch Zucht im Laboratorium selbst herstellen, so impft man geeignete Nährlösung, die man z. B. in Erlenmeyerkolben sterilisiert hat, mit den Pilzkulturen und kultiviert bei der für das Wachstum der verwandten Pilze optimalen Temperatur. Schon nach 2—3 Wochen kann man so, wie mir zahlreiche Erfahrungen gelehrt haben, genügende Mengen von Pilzsubstanz, z. B. Mycel von Schimmelpilzen, heranzüchten, um daraus eine zur Zucker- oder Polypeptidspaltung etc. genügende Menge von Preßsaft zu gewinnen. [1]) Das Verfahren unterscheidet sich von dem vorher beschriebenen hauptsächlich darin, daß man das gewaschene Pilzmycel nicht in der hydraulischen Presse entwässert, sondern nur durch den Druck der Hand vom außen anhaftenden Wasser befreit, ehe man das Zerreiben beginnt. Dadurch wird der Preßsaft zwar verdünnt; man gewinnt jedoch immer noch recht wirksame Säfte. Entwässert man zu stark, so fließt beim Pressen infolge der geringen vorhandenen Flüssigkeitsmenge fast gar nichts ab; man muß dann die hervortretenden Tropfen abspülen und kommt zu keinem besseren, sondern zu einem schlechteren Resultat, da der im Innern zurückbleibende Saft nicht ausgewaschen wird. Schimmelpilzmycele sind mit Sand viel leichter als Hefe zu zerreiben; man kann schon an der Feinheit des erhaltenen Pulvers leicht beurteilen, wann man genügend Sand zugesetzt und gerieben hat. Auch die Bildung der plastischen Masse mit Kieselgur wird durch eine geringe Feuchtigkeit des zu zerreibenden Mycels sehr begünstigt. Die hydraulische Presse muß mit einem genügend kleinen durchlochten Preßkorb mit hineingepaßter Preßplatte ausgestattet sein, wenn es sich um kleine Portionen von Säften handelt. Man kann solche Körbe speziell anfertigen lassen und sie an Stelle der größeren auf der Platte der Presse aufstellen.

Aus dem in 20 Erlenmeyerkolben (1 *l*) herangezogenen Pilzmycel kann man so leicht 10, 20 oder auch mehr Kubikzentimeter Preßsaft je nach der Art des Pilzes gewinnen und mit 1 cm^3 des Saftes Zucker- oder andere Spaltungen ausführen.

C. Darstellung von Acetondauerpräparaten.

In manchen Fällen ist es vorzuziehen, sich ein haltbares Enzympräparat von Pilzen herzustellen, das man wie die käufliche Acetondauer-

---

[1]) Vgl. *E. Abderhalden* und *H. Pringsheim*, Studien über die Spezifizität der peptolytischen Fermente bei verschiedenen Pilzen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 59. S. 249 (1909).

hefe, das Zymin von Schröder in München, Landwehrstraße 45, anwenden kann. Man verfährt, wie bei der Herstellung der Dauerhefe angegeben.[1]) Das zuerst unter einem Druck von 50 Atmosphären entwässerte Pilzmycel wird fein zerschnitten in Aceton eingetragen und im Aceton durch Schwemmen gut verteilt. Es bleibt 10 Minuten im Aceton; hierauf wird nach kurzem Absetzen die Flüssigkeit abgegossen und an einer Nutsche unter kräftigem Anpressen mit einem geeigneten Stempel möglichst trocken abgesaugt. Den nunmehr grob zerkleinerten Preßkuchen übergießt man aufs neue in einer Schale mit Aceton, rührt 2 Minuten lang damit durch und saugt von neuem ab. Die Masse wird sodann grob gepulvert und in einer kleinen Schale mit Äther übergossen; nach 3 Minuten dauernder Einwirkung, die durch Umrühren unterstützt wird, saugt man den Äther auf der Nutsche ab und breitet die zu einem feinen Pulver zerriebene Masse in dünner Schicht auf Filtrierpapier aus. Nach $^1/_2$—1 Stunde Lagern an der Luft bringt man in einen Trockenschrank und trocknet 24 Stunden bei 45°.

---

[1]) *R. Albert, E. Buchner* und *R. Rapp,* Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. 35. S. 2376 (1902).

Untersuchung auf Fette.

Von **F. Röhmann**, Breslau.

Gewinnung der Fette und der in Äther löslichen Bestandteile der Organe.

Die Fette des Fettgewebes lassen sich durch Ausschmelzen gewinnen. Man zerkleinert das Fett, erhitzt, wenn es sich um kleine Mengen handelt, in einer Porzellan- oder emaillierten Eisenschale auf dem Sand- oder im Wasserbade und filtriert durch ein Faltenfilter, das sich in einem Heißwassertrichter befindet. Größere Mengen werden in geeigneten Gefäßen mit Dampf erhitzt. Die pflanzlichen Öle werden aus den ölhaltigen Samen, das Palmöl aus dem Fruchtfleisch der Palmfrüchte durch Auspressen gewonnen. Von wesentlicher Bedeutung ist hierbei die Temperatur, bei der das Auspressen geschieht. Bei niederen Temperaturen erhält man ein reineres Öl. Diesem können fettspaltende Fermente, Lipasen, beigemengt sein, welche das Fett allmählich in Fettsäuren und Glyzerin spalten, so daß die Säurezahl solcher Fette beim Lagern zunimmt. Preßt man bei höheren Temperaturen, so löst das Fett mannigfach andere Stoffe, die in den pflanzlichen Geweben enthalten waren und unter anderem durch Nachdunkeln die Farbe des Öles beeinflussen.

Die im Preßkuchen zurückbleibenden Fette lassen sich durch Benzin, Schwefelkohlenstoff, Äther oder Chlorkohlenstoff extrahieren. Schwefelkohlenstoff löst hierbei auch die durch Oxydation verharzten Fette, während Benzin dies in viel geringerem Maße tut.

Zur Extraktion der Preßkuchen im Laboratorium dienen, wenn es sich um kleine Mengen handelt, Soxhletapparate; für die Extraktion von größeren Mengen Extraktionsapparate, wie in Bd. I. S. 184.

Ein vorheriges Trocknen der zu entfettenden Substanzen ist nicht zu empfehlen. Ebenso dürfte es für chemische Untersuchungen wohl zweckmäßig sein, die Samen nicht vor dem Entfetten fein zu mahlen, sondern erst die Hauptmenge des Öls durch Pressen oder Extrahieren zu entfernen und erst dann den Rückstand zu zerkleinern, da in einem feinen Pulver durch Oxydationen — besonders bei Anwesenheit von ungesättigten Fettsäuren — leicht Veränderungen eintreten können.

Es seien im folgenden die Eigenschaften der wichtigsten Extraktionsmittel angeführt.

Schwefelkohlenstoff (Siedepunkt 46·2, spez. Gew. 1·292 bei 0° C) zersetzt sich allmählich beim Lagern; längeres Arbeiten mit ihm ist gesundheitsschädlich, mit Luft gemischt bildet er ein brennbares, explosibles Gas, er ist besonders feuergefährlich, da sein Dampf sich an Metallflächen, welche über 150° heiß sind, entzündet.

Benzin (Petroleumbenzin) besteht aus einem Gemisch der bis 150° siedenden, als Nebenprodukt bei der Petroleumbereitung gewonnenen Kohlenwasserstoffe. Für die Untersuchung der Fette im Laboratorium dient der Teil, der sich vom Wasserbade abdestillieren läßt. Will man diesen selbst im Laboratorium gewinnen, so hat dies mit besonderer Vorsicht zu geschehen. Man hat darauf zu achten, daß sehr gut gekühlt wird, da die Dämpfe der zuerst übergehenden, sehr leicht siedenden Teile, mit Luft gemischt, sich selbst am Sicherheitsdrahtnetz, das das Wasserbad umgibt, entzünden können.

Der Vorzug des Benzins ist seine geringe Löslichkeit in Wasser.

Tetrachlorkohlenstoff (Siedepunkt 76·75° C bei 760 *mm* Hg, spezifisches Gewicht bei 0° bzw. auf Wasser von 4° 1·6319). 100 *g* Wasser lösen bei 0° 0·097 *g*, bei 10° 0·083 *g*, bei 20° 0·080 *g*, bei 30° 0·085 *g*. Der Tetrachlorkohlenstoff ist schwer entzündbar und auch in Dampfform nicht explosiv. Er besitzt dasselbe Lösungsvermögen für Fette wie Benzin und Schwefelkohlenstoff und ist mit den gebräuchlichsten Lösungsmitteln in jedem Verhältnisse mischbar. Er ist für die Gesundheit anscheinend nicht schädlicher als die anderen Extraktionsmittel.

Für die Fettextraktion ist Anwendung von vollkommen reinem Chlorkohlenstoff nicht nötig, es genügt der käufliche. Beim Verdampfen von 50 cm^3 darf aber kein wägbarer Rückstand hinterbleiben. Mit konzentrierter Schwefelsäure geschüttelt, soll sich eine Probe nicht gelb oder bräunlich färben (Abwesenheit fremder Halogenverbindungen), beim Schütteln mit Silbernitrat entstehe keine weißliche Trübung durch Chlorsilber, beim Schütteln mit Jodkalium färbe sich der Schwefelkohlenstoff nicht violett infolge Anwesenheit von Chlor.

Gewinnung der Gesamtmenge der in Äther löslichen Bestandteile aus Organen.

Für viele Fragen der Tier- und Pflanzenphysiologie ist es notwendig, die Gesamtmenge der in Äther, Petroläther usw. löslichen Stoffe zu gewinnen. Eine unmittelbare Extraktion mit den Fettlösungsmitteln ist im allgemeinen nicht ratsam und bei tierischen Organen wegen ihres Wassergehaltes unmöglich.

Will man die Organe trocknen, so hat dies im Vakuum (siehe Bd. I. S. 163) zu geschehen, nachdem man sie in einer Fleischmühle fein zermahlen und in dünner Schicht ausgebreitet hat (vgl. das wohl der Verbesserung fähige Verfahren von *A. Erlandsen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **51**. S. 83 [1907]). Einfacher und meist vorzuziehen ist es, die zermahlenen tierischen Organe und die abgepreßten oder ausgequetschten Samen zuerst mit Alkohol mehrmals auszukochen, die ausgekochten Massen gut abzupressen und bei gelinder Temperatur (Anwendung eines Ventilators?) zu trocknen, dann in einer Mühle fein zu mahlen und im Soxhletapparat mit Petroläther völlig zu extrahieren. Der heiße Alkohol nimmt hierbei außer Fetten auch Lezithine auf und andere Stoffe, die sich in Alkohol sowie in Fetten und Lezithinen lösen. Man dampft den Alkohol im Vakuum (siehe Bd. I. S. 152) ab, soweit als dies möglich ist, und schüttelt die wässerig alkoholische Lösung mit Petrol-

äther (siehe S. 246) aus. Emulsionen, die sich beim Schütteln bilden, sucht man durch Zusatz von Alkohol oder durch gelindes Erwärmen zu trennen. Anstatt zu schütteln, kann man auch kontinuierlich extrahieren.

Zur kontinuierlichen Extraktion eines wässerig-alkoholischen Extraktes mit Petroläther kann man den Apparat von *Zelmanowitz*[1]) benutzen (s. Bd. I. S. 181). Für kleinere Mengen genügt ein Soxhletapparat[2]) (s. Fig. 13). Man bringt auf seinen Boden Glasperlen, füllt die zu extrahierende Flüssigkeit ein, so daß ihre Oberfläche etwa 1 *cm* unter der Umbiegung des Hebers bleibt, und stellt einen Trichter mit entsprechend langem Fuß in den Apparat. Der Petroläther, der im Kolben vom geschützten Wasserbade aus verdampft, wird im Kühler kondensiert, fällt auf den Trichter und gelangt durch die zu extrahierende Flüssigkeit zu deren Oberfläche, um durch den Heber abzulaufen.

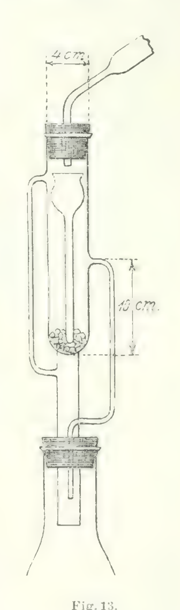


Fig. 13.
Extraktionsapparat nach *Hönig* und *Spitz*.

Der Äther und Petroläther nehmen bei der Extraktion außer Fetten und Lezithin auch eine Reihe anderer Stoffe auf: aus einer Seifenlösung Seifen, aus Extrakten von Lebern und manchen Samen Dextrine, Zucker u. a. m. Es ist deswegen durchaus nötig, den Extrakt vor der weiteren Untersuchung wiederholt mit Wasser bzw. verdünntem Alkohol zu schütteln, bis in diesem nichts mehr von den Verunreinigungen nachweisbar ist.

Bevor man den Petroläther oder Äther abdestilliert, läßt man den Extrakt eine Zeitlang stehen und gießt von ausgeschiedenen Wassertropfen durch ein trockenes Filter in einen trockenen Kolben ab. Bei leicht oxydierbaren Fetten verdunstet man das Lösungsmittel im trockenen Kohlensäure- oder Wasserstoffstrome.

Aufbewahrung der Fette etc. Die Fette und ätherlöslichen Bestandteile der Organe, die man erst einige Zeit nach der Gewinnung verarbeiten will, sind sorgfältig zu trocknen und in luftdicht verschlossenen Gefäßen vor Licht geschützt aufzubewahren. Enthalten die Fette (Pflanzenextrakte) Lipasen, so wird es sich vielleicht in manchen Fällen empfehlen, die Fette zuvor in einer Atmosphäre von trockener Kohlensäure auf eine höhere Temperatur zu erhitzen.

---

[1]) Über einen neuen Apparat zur Extraktion wässeriger Flüssigkeiten mittelst Äther, Ligroin usw. Biochem. Zeitschr. Bd. 1. S. 254 (1906).

[2]) *M. Hönig* und *G. Spitz*, Untersuchung von Gemengen von unverseifbarem und verseifbarem Fett. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 31. S. 477 (1892).

Physikalische Untersuchungsmethoden der Fette, Wachse und der aus ihnen dargestellten Fettsäuregemische.

1. Spezifisches Gewicht.

Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes der Fette und der Fettsäuren geschieht für gewöhnlich mittelst Pyknometer (s. Bd. I. S. 440).

Für die Bestimmung fester Fette empfiehlt *Ubbelohde* das beistehend abgebildete Pyknometer.

Pyknometer von *Ubbelohde*.[1]) Der Apparat (s. Fig. 14) besitzt bei 15° einen Inhalt von 10 cm^3 und wird mit Wasser von 15° gefüllt. Das Taragewicht ist gleich dem Gewichte des mit Wasser von 15° gefüllten Apparates. Der Ansatz des Kapillarröhrchens ist nahe dem Boden, damit die schwimmenden Fettstücke das Röhrchen nicht verstopfen.



Fig. 14.
Pyknometer nach *Ubbelohde*.

Versuchsausführung. Man fügt eine gewogene Menge m in Stücken geschnittenen Stoffs durch den Hals des mit Wasser von 15° gefüllten Pyknometers ein, setzt den Stopfen auf und ermittelt das Zusatzgewicht m_1, mit welchem die Wage wieder einsteht. Dieses Zusatzgewicht plus dem Gewicht m ergibt das Volumen V des Fettes, folglich ist das spezifische Gewicht bei 15°, bezogen auf Wasser von 15°, für Stoffe leichter als Wasser $m/m+m_1$, für Stoffe schwerer als Wasser $m/m-m_1$.

Spezifische Gewichte einiger Fette.[2])

Fett	Spezifisches Gewicht bei 100° C, bezogen auf Wasser von 15°	Fett	Spezifisches Gewicht bei 15·5° C bezogen auf Wasser von 15·5°
Kakaobutter	0·857	Olivenöl	0·9168
Palmöl	0·857	Rüböl	0·9168
Japanwachs	0·8755	Arachisöl	0·9209
Kokosnußöl	0·8736	Baumwollensamenöl	0·9225
Palmkernöl	0·8731	Leinöl	0·9325
Schweinefett	0·861	Rizinusöl	0·9679
Rinds- und Hammeltalg	0·860		
Butterfett	0·865—0·868		

2. Schmelpunkt.

Die Fette und auch die aus ihnen gewonnenen Fettsäuregemische haben keinen scharfen Schmelzpunkt. Man bestimmt, so genau als dies

[1]) Verfertiger Dr. *H. Göckel*, Berlin, Luisenstraße 21.

[2]) Siehe *J. Lewkowitsch*, Chem. Technologie und Analyse der Öle, Fette und Wachse. Braunschweig 1905. I. S. 186.

gerade möglich ist, die Temperatur, bei der die Fette zu schmelzen beginnen und die, bei welcher das Fett völlig klar geworden ist („Beginn“ und „Endpunkt“ des Schmelzens).

Zur **Bestimmung des Schmelzpunktes** saugt man das geschmolzene Fett in eine an beiden Enden offene Kapillare von U-Form, so daß das Fett in beiden Schenkeln gleich hoch steht. Man läßt bis zum folgenden Tage im Kühlen liegen. Dann befestigt man die Kapillare mittelst eines kleinen Gummiringes am Thermometer, das mittelst locker schließenden Korkens in einem weiten Reagenzrohre befestigt ist und erwärmt dieses langsam im Wasserbade.

Statt dessen kann man auch nach *Bensemann* so verfahren, daß man in eine Kapillare mit kugelförmiger Erweiterung (s. Fig. 15) das geschmolzene Fett einsaugt und es seitlich erstarren läßt. Das eine Ende wird zugeschmolzen. Am folgenden Tage befestigt man das Röhrchen am Thermometer und taucht dieses in ein nicht zu kleines Becherglas mit Wasser, das man langsam unter Umrühren erwärmt. Bei einer bestimmten Temperatur fließt der Tropfen herunter, bei einer höheren wird er klar.

3. Erstarrungspunkt.

Als wahren Schmelzpunkt hat man auch bei den Fetten diejenige Temperatur zu bezeichnen, bei welcher Wärme latent und als Erstarrungspunkt die höchste Temperatur, bei welcher die latente Wärme frei wird.[1]) Es müßte, wenn man ein festes Fett mit eingesetztem Thermometer langsam erwärmt, an einem bestimmten Punkt, während das Fett schmilzt, die Temperatur stehen bleiben. Das ist aber bei den Fetten aus bestimmten Gründen nicht der Fall. Der Schmelzpunkt läßt sich in dieser Weise meist nicht bestimmen.

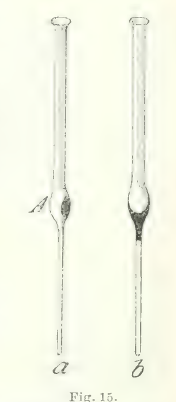


Fig. 15.
Röhrchen zur Bestimmung des Schmelzpunktes von Fetten nach *Bensemann*.

Dagegen ist bei den festeren Fetten der **Erstarrungspunkt** häufig gut festzustellen.

Hat man ein Fett bzw. das aus ihm gewonnene Fettsäuregemisch geschmolzen und läßt es abkühlen, so sinkt die Temperatur zuerst gleichmäßig. Dann tritt bei manchen Fetten ein Punkt ein, wo sie eine Zeitlang unverändert bleibt, während sich feste Massen ausscheiden, und sinkt dann weiter. Der Temperaturstand, bei dem die Temperatur im erstarrenden Gemisch konstant bleibt, ist der Erstarrungspunkt. Bei weicheren Fetten bzw. deren Fettsäuren bleibt die Temperatur nicht an einem Punkte stehen. Es verlangsamt sich, während sich die festen Massen ausscheiden, nur die Geschwindigkeit des Sinkens. Hier ist der Erstarrungspunkt nicht genau zu bestimmen.

---

[1]) *Fr. Rüdorff*, Über die Bestimmung der Schmelz- und Erstarrungstemperatur der Fette und anderer Verbindungen. *Poggendorffs* Ann. [5.] Bd. **20**. S. 420 (1870).

In geschmolzenen festen Fetten bzw. deren Fettsäuren sinkt beim Abkühlen die Temperatur zuerst dauernd und steigt dann bei einer gewissen Temperatur wieder an. Das Fett war unterkühlt. In diesem Fall ist das Maximum der Temperatur, welches während der Ausscheidung der festen Teile erreicht wird, der Erstarrungspunkt.

Zur Bestimmung des Erstarrungspunktes verfährt man bei wissenschaftlichen Untersuchungen ähnlich wie bei einer Gefrierpunktsbestimmung. Man bringt die gut getrockneten Fettsäuren in ein entsprechend weites Reagenzglas und schmilzt sie mit eingesetztem, in Zehntelgrade geteiltem Thermometer. Dieses Reagenzglas befestigt man mittelst eines Korkes in einem weiteren Rohre, auf dessen Boden sich einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure befinden. Diese sollen das Beschlagen der Wände verhindern, wenn die Erstarrungstemperatur unterhalb der Zimmertemperatur liegt. Man taucht nun den Apparat in ein nicht zu kleines Becherglas mit Wasser, dessen Temperatur etwa 10° C über dem Erstarrungspunkte des Fettes liegt und beobachtet die Temperatur des Fettes, indem man sowohl dieses als auch Wasser des Becherglases wie bei einer Gefrierpunktbestimmung rührt und in gleichen Zeiträumen die Temperatur notiert.

Bei der Untersuchung von Talg in der Technik benutzt man den Apparat von *Finkener.*[1])

4. Lichtbrechungsvermögen.

Die verschiedenen Fette und die aus ihnen gewonnenen Fettsäuren zeigen sehr verschiedene Brechungsexponenten. Die Bestimmung des Brechungsexponenten bildet deshalb eine sehr wesentliche Vorprobe bei der Untersuchung der Fette zum Zweck der Nahrungsmittelkontrolle und könnte wohl auch mehr als bisher bei biologischen Untersuchungen verwertet werden.

Die Bestimmung geschieht im *Pulfrich*schen Refraktometer oder bei Butteruntersuchungen im Butterrefraktometer bzw. *Amagat-Jeans* Oleorefraktometer (siehe Bd. I. S. 568 ff.).

Brechungsexponenten.[2])

Fett	Temperatur	Brechungsexponent	Fett	Temperatur	Brechungsexponent
Olivenöl	15°	1·4698—1·4716	Kokosnußöl . . .	60°	1·4410
Rüböl	„	1·4720—1·4757	Palmkernöl . . .	„	1·4431
Baumwollsamenöl .	„	1·4743—1·4752	Kakaobutter . . .	„	1·4496
Sesamöl	„	1·4748—1·4762	Mandelöl	„	1·4550
Rizinusöl	„	1·4799	Mohnöl	„	1.4586
Leinöl	„	1·4835	Sonnenblumenöl .	„	1·4611
Dorschleberöl . .	„	1·4800—1·4852	Rindstalg	„	1·4510
Eieröl	25°	1·4713	Hammeltalg . . .	„	1·4510
Butterfett	60°	1·4480—1·4450	Schweinefett . . .	„	1·4539

[1]) Siehe *G. Lebbin*, Amtliche Untersuchungsmethoden für Chemiker. Berlin 1907. S. 72.

[2]) *J. Lewkowitsch*, Chemische Technologie und Analyse der Öle, Fette und Wachse. Braunschweig 1905. I. S. 210.

5. Drehungsvermögen.

Ausführung der Untersuchung siehe Bd. I. S. 583 ff.

Die polarimetrische Untersuchung kann bei der Untersuchung der Fette und des Ätherextrakts der Organe mitunter sehr wesentliche Dienste leisten, da sich in den Fetten optisch aktive Substanzen, wie Lezithine, Cholesterin und Phytosterin auflösen und in Pflanzenextrakten auch optisch aktive Fettsäuren sowie deren Ester vorkommen. Meist zeigen die natürlich vorkommenden Fette und Öle nur eine sehr geringe Links- oder Rechtsdrehung.[1])

Es dreht im 2 Dezimeterrohr das Öl von

Erdnuß	+ 4′ 20″ bis 27′ 20″	Croton . .	+ 9° 10′ bis 9° 20′
süßen Mandeln .	— 2′ 30″	Lein . . .	— 1′ bis 3′
Hanf	— 6′ 30″	Oliven . .	+ 9′ 50″
Baumwollensamen	— 9′	Rizinus . .	+ 8′ 50″
		Sesam . .	+ 44′ bis 1° 5′.

Allgemeine chemische Untersuchungsmethoden der Fette und Wachse.

1. Säurezahl.

Die Säurezahl gibt die Menge Kalihydrat in Milligrammen an, welche erforderlich ist, um 1 *g* von dem in Alkoholäther gelösten Fett für Phenolphtalein zu neutralisieren. Man wiegt das Fett in einem trockenen *Erlenmeyer*schen Kölbchen genau ab, löst in einem neutralen Gemisch von 2 Teilen Äther und 1 Teil Alkohol und titriert unter Anwendung von Phenolphtalein (1%ige alkoholische Lösung) mit zehntelnormaler, alkoholischer oder wässeriger Kalilauge. Die Titration ist beendet, wenn das Gemisch während einiger Minuten rot bleibt. Bei längerem Stehen entfärbt sich die Lösung wieder.

2. Verseifungszahl (Köttstorferzahl[2]).

Die Verseifungszahl gibt die Anzahl Milligramme Kalihydrat an, welche von 1 *g* Fett bei der Verseifung gebunden werden.

Erforderlich sind für die Bestimmung: 1. eine titrierte, etwa halbnormale Salzsäure. Manche ziehen wegen einer angeblich größeren Haltbarkeit eine Schwefelsäure vor. Der Titre wird in üblicher Weise mit Sodalösung unter Anwendung von Methylorange- oder Lakmoidlösung bestimmt: 2. eine titrierte etwa halbnormale Kalilauge. Etwa 28 *g* Kalium hydricum werden in 30—40 cm^3 Wasser gelöst und nach dem Abkühlen im Liter-

[1]) *Peter,* Wirkung der Öle auf polarisiertes Licht. Chemikerzeitung. Jg. **1887**. Rep. S. 267; *M. Rakusin,* Über das optische Drehungsvermögen der Pflanzenfette. Chem. Zentralbl. 1905 II. S. 523.

[2]) Neue Methode zur Untersuchung der Butter auf fremde Fette. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **18**. S. 199 (1879).

kolben mit reinem Alkohol auf 1 *l* aufgefüllt. Am folgenden Tage gießt man die Lauge von etwa ausgeschiedener Kaliumkarbonatlösung in die Vorratsflasche ab.

Reinigung des Alkohols nach *Waller*. Man versetzt mehrere Liter Alkohol mit so viel gepulvertem Kaliumpermanganat, daß die Flüssigkeit sich dunkelrot färbt. Das Mangansuperoxyd, das sich nach einiger Zeit abscheidet, wird durch ein Faltenfilter abfiltriert. Das Filtrat schüttelt man einige Zeit mit Calciumkarbonat und destilliert dann den Alkohol nach Zusatz einiger Bimssteinstückchen aus einem großen Kolben unter Anwendung eines Fraktionieraufsatzes (siehe Bd. I. S. 125 ff.) langsam ab. Vom Destillat kocht man in einem Reagenzglase vorsichtig etwa 10 cm^3 mit 1 cm^3 sirupöser Kalilauge. Die ersten Proben färben sich braun, dann gelb, dann bleiben sie farblos. Tritt auch nach 20—30 Minuten keine Gelbfärbung ein, so destilliert man den Alkohol nunmehr in etwas schnellerem Tempo bis auf einen kleinen Rest ab. Auch die mit solchem Alkohol hergestellte Kalilauge kann sich beim Stehen allmählich noch gelb färben. Wenn man dies vermeiden will, so rektifiziert man den nach *Waller* gereinigten Alkohol noch einmal über festes Kali- oder Natronhydrat oder benutzt von vorneherein den käuflichen 99%igen Alkohol.

Zur Titrestellung der Kalilauge entnimmt man aus der Vorratsflasche mit der Pipette 25 cm^3, erhitzt auf kochendem Wasserbade zum schwachen Sieden, setzt etwa 25 cm^3 destilliertes Wasser und etwas Phenolphtalein hinzu und bestimmt die zur Neutralisation erforderliche Menge Halbnormalsalzsäure. Der Titre der alkoholischen Kalilauge ändert sich mit der Zeit, muß also öfters kontrolliert werden.

Die Bestimmung der Verseifungszahl geschieht in folgender Weise: Man wiegt in einem 150—200 cm^3 fassenden Erlenmeyerkölbchen aus Jenenser Glas 1·5—2 *g* des trockenen Fettes ab und läßt mit der bei der Titrestellung gebrauchten Pipette 25 cm^3 der alkoholischen Kalilauge zufließen. In den Hals des Kolbens wird ein kleiner Trichter gesetzt oder er wird bei Fetten, die, wie z. B. Butter, flüchtige Ester enthalten, mit einem Rückflußkühler verbunden. Man stellt das Kölbchen auf ein zuvor angeheiztes Wasserbad und erhitzt unter häufigem Umschwenken eine $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang zum schwachen Sieden. Die Lösung muß völlig klar sein. Etwa herumschwimmende Öltröpfchen zeigen im allgemeinen an, daß die Verseifung noch nicht beendet ist. Ist zu viel Alkohol weggekocht, so setzt man eine entsprechende Menge reinen Alkohol hinzu, verdünnt mit 25 cm^3 Wasser und titriert nach Zusatz von Phenolphtalein die überschüssige Menge Kalilauge mit Salz- oder Schwefelsäure. Der Unterschied zwischen der bei der Titrestellung und der nach der Verseifung verbrauchten Menge Salzsäure entspricht der Menge Kalilauge, die bei der Verseifung gebunden wurde. Man berechnet aus ihr die Anzahl Milligramme KOH und bezieht sie auf 1 *g* des angewendeten Fettes.

Bei der Titrierung von dunklen Fetten kann man zuweilen mit Erfolg statt Phenolphtalein als Indikator Alkaliblau (Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning) benutzen. 2 *g* des Farbstoffes werden in 100 cm^3 90%igem Alkohol gelöst und mit verdünnter Kalilauge bis zum Verschwinden der blauen Farbe versetzt. Je nach der Färbung des Fettes werden mehr oder weniger dieser Indikatorlösung zu der verseiften Lösung gesetzt.[1])

---

[1]) *Benedikt-Ulzer*, Chemie d. Fette. Berlin 1897. S. 133.

Verseifungszahlen von Triglyzeriden.

	Formel	Molekulargewicht	Verseifungszahl
Acetin	$C_3 H_5 (OC_2 H_3 O)_3$	218	772·0
Butyrin	$C_3 H_5 (OC_4 H_7 O)_3$	302	557·3
Valerin	$C_3 H_5 (OC_5 H_9 O)_3$	344	489·2
Caproin	$C_3 H_5 (OC_6 H_{11} O)_3$	386	436·1
Caprylin	$C_3 H_5 (OC_8 H_{15} O)_3$	470	358·1
Caprin	$C_3 H_5 (OC_{10} H_{19} O)_3$	554	303·7
Laurin	$C_3 H_5 (OC_{12} H_{23} O)_3$	638	263·8
Myristin	$C_3 H_5 (OC_{14} H_{27} O)_3$	722	233·1
Palmitin	$C_3 H_5 (OC_{16} H_{31} O)_3$	806	208·8
Stearin	$C_3 H_5 (OC_{18} H_{35} O)_3$	890	189·1
Olein	$C_3 H_5 (OC_{18} H_{33} O)_3$	884	190·4
Erucin	$C_3 H_5 (OC_{22} H_{41} O)_3$	1052	160·0
Oleo-palmito-stearin	$C_3 H_5 (OC_{16} H_{31} O) . (OC_{18} H_{35} O) . (OC_{18} H_{33} O)$	860	195·7
Oleo-dipalmitin	$C_3 H_5 (OC_{16} H_{31} O)_2 (OC_{18} H_{33} O)$	832	202·3
Oleo-distearin	$C_3 H_5 (OC_{18} H_{35} O)_2 (OC_{18} H_{33} O)$	888	189·5
Stearo-dipalmitin	$C_3 H_5 (OC_{16} H_{31} O)_2 (OC_{18} H_{35} O)$	834	201·8
Palmito-distearin	$C_3 H_5 (OC_{16} H_{31} O) (OC_{18} H_{35} O)_2$	862	195·2

Verseifungszahlen von Estern aus hochmolekularen Alkoholen und hochmolekularen Säuren.

Ester	Formel	Molekulargewicht	Verseifungszahl
Cetylpalmitat	$C_{16} H_{33} O . C_{16} H_{31} O$	480	116·9
Octadecylpalmitat	$C_{18} H_{37} O . C_{16} H_{31} O$	508	110·4
Cerylpalmitat	$C_{26} H_{53} O . C_{16} H_{31} O$	620	90·5
Myricylpalmitat (Myricin)	$C_{30} H_{61} O . C_{16} H_{31} O$	676	83·0
Cetylstearat	$C_{16} H_{33} O . C_{18} H_{35} O$	508	110·4
Cerylcerotat	$C_{26} H_{53} O . C_{26} H_{51} O$	760	73·8
Cholesterinpalmitat	$C_{26} H_{43} O . C_{16} H_{31} O$	610	92·0
Cholesterinstearat	$C_{26} H_{43} O . C_{18} H_{35} O$	638	87·9
Cholesterinoleat	$C_{26} H_{43} O . C_{18} H_{33} O$	636	88·2

Die Verseifungszahlen sind, wie die Tabellen zeigen, in hohem Maße abhängig von der Zusammensetzung des Fettes. Für die Triglyzeride, welche als einzige Säuren Palmitin-, Stearin- und Ölsäure enthalten, liegt die Verseifungszahl zwischen 189·5 und 204·3. Ist die Verseifungszahl größer, so sind diesen Triglyzeriden Säuren mit kleinerem Molekulargewicht bzw. deren Glyzeride (oder Ester niedrigerer Alkohole) beigemengt. Ist sie kleiner, so enthalten die Fette bzw. Wachse hochmolekulare Alkohole oder deren Ester.

Bestimmt man die Verseifungszahl in der angegebenen Weise, so enthält sie neben der bei der Verseifung gebundenen Menge Kalihydrat auch die Menge Kalihydrat, die von etwaigen in den Fetten vorhandenen freien Fettsäuren gebunden wird. Will man dies zum Ausdruck bringen, so subtrahiert man von der Verseifungszahl die Säurezahl (siehe S. 205) und bezeichnet die Differenz als „Ätherzahl" oder „Esterzahl".

Bei der Bestimmung der Verseifungszahl von Organextrakten, bei der Untersuchung der Extrakte des Kots u. a. ist auch der Gehalt an Lezithin zu berücksichtigen. Das Lezithin zerfällt beim Kochen mit alkoholischer Kalilauge zunächst in glyzerinphosphorsaures Kalium, Cholin und Kaliseifen:

$$C_3H_5 \begin{matrix} OC_{16}H_{31}O \\ OC_{18}H_{35}O \\ OPO-O-C_2H_4.N(CH_3)_3OH \\ \diagdown OH \end{matrix} + 4\,KOH = C_3H_5 \begin{matrix} (OH)_2 \\ OPO_3K_2 \end{matrix} +$$

Lezithin — Glyzerinphosphorsaures Kalium

$$C_{16}H_{31}O_2K + C_{18}H_{35}O_2K + HO.C_2H_4.N(CH_3)_3OH$$

Palmitinsaures Kali — Stearinsaures Kalium — Cholin

und das Cholin bei längerem Kochen anscheinend in Glykol und Trimethylamin. Es würden hiernach von einem Molekül Lezithin (Mol.-Gew. 749) 4 Moleküle Kalihydrat gebunden werden, die Verseifungszahl wäre 299. Ein Gemisch von Fett und Lezithin müßte also eine höhere Verseifungszahl haben als Fett allein. Ist diesem Gemisch aber noch Cholesterin beigemischt, wie z. B. in der Leber, so wird die Verseifungszahl wieder herabgedrückt. In der Tat wurden von *Y. Nukada* für die Verseifungszahl der im Petroläther löslichen Bestandteile von Rinds-, Pferde- und Hammelleber trotz der Anwesenheit erheblicher Mengen von Lezithin nur Werte von 192—197 gefunden.[1])

3. Jodzahl.

Die Jodzahl gibt die Menge des Jods an, die in Gegenwart von Quecksilberchlorid aus einer alkoholischen Jodlösung bei Zimmertemperatur von einem Fette aufgenommen wird. Sie ist ein Maß für die Menge der in einem Fette enthaltenen ungesättigten Verbindungen (Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Cholesterin u. a.). Zur Bestimmung sind erforderlich:

1. Jodlösung nach *v. Hübl.* Man löst 25 *g* Jod und 30 *g* Quecksilberchlorid je in 500 *cm*³ 95°/₀igem reinen Alkohol. Die Quecksilberlösung wird, wenn nötig, filtriert. 24 Stunden vor dem Gebrauch werden gleiche Teile beider Lösungen gemischt, da besonders in der ersten Zeit nach der Mischung der Jodgehalt schnell abnimmt. Eine weit beständigere Jodlösung erhält

[1]) Zur Kenntnis der tierischen Fette und des Petrolätherextraktes der Leber. Biochem. Zeitschr. Bd. 14. S. 426 (1908).

man nach *Waller*[1]), wenn man zu je 1 *l* der Mischflüssigkeit 50 cm^3 konzentrierte Salzsäure vom spez. Gew. 1·19 hinzusetzt.

2. Natriumthiosulfatlösung: etwa 25 *g* $Na_2S_2O_5 + 5H_2O$ (Mol.-Gew. 248·3) im Liter.

Zur Titrestellung löst man 1·6254 *g* reinstes Kaliumbijodat in Wasser und füllt auf 500 cm^3 auf. Dann bringt man 1—2 *g* reines Jodkalium in ein Becherglas, löst es in möglichst wenig Wasser, fügt 5 cm^3 Salzsäure (1 : 5) hinzu und hierauf 20 cm^3 der Kaliumbijodatlösung. Es scheiden sich 20 × 12·68 *mg* Jod ab. Man verdünnt mit etwa 200 cm^3 Wasser und läßt unter Umrühren aus der Bürette Natriumthiosulfatlösung zufließen, bis die Lösung nur noch schwach gelb gefärbt ist, setzt jetzt etwas Stärkelösung hinzu und läßt weiter vorsichtig Thiosulfatlösung eintropfen, bis die Blaufärbung verschwindet. Man erfährt so die Anzahl Kubikzentimeter Natriumthiosulfatlösung, die erforderlich sind, um 0·2536 *g* Jod zu reduzieren und berechnet hieraus den Titre für 1 cm^3 der Thiosulfatlösung.

3. Chloroform.

4. 10%ige Jodkaliumlösung.

5. Stärkelösung, 0·5%ig, am einfachsten durch Erhitzen von „löslicher Stärke" in destilliertem Wasser.

Ausführung der Bestimmung.

Man bringt von trocknenden Ölen etwa 0·15—0·18 *g*, von nicht trocknenden 0·3—0·4 *g*, von festen Fetten 0·8—1·0 *g* in ein etwa 2½—3 *cm* hohes, an einem Ende geschlossenes Röhrchen von 1—1½ *cm* Durchmesser, das in einem Wiegegläschen leer gewogen wurde und wiegt in demselben Wiegegläschen das Gläschen mit dem Fette. Dann läßt man das Röhrchen mit dem Fette in eine 500—800 cm^3 fassende, mit gut eingeriebenem Glasstopfen versehene Flasche gleiten und löst das Fett in 10 cm^3 Chloroform. Nun bringt man mittelst der bei der Titrestellung benutzten Pipette 25 cm^3 Jodlösung in die Flasche, indem man die Pipette in demselben langsamen Zeitmaß wie bei der Titrestellung aus- und am Ende dieselbe Anzahl Tropfen nachfließen läßt. Sollte die Flüssigkeit nach dem Umschwenken nicht völlig klar sein, so wird noch etwas Chloroform hinzugefügt. Tritt binnen kurzer Zeit fast vollständige Entfärbung der Flüssigkeit ein, so werden weitere 25 cm^3 der Jodlösung hinzugegeben. Die Jodmenge muß so groß sein, daß noch nach 1½—2 Stunden die Flüssigkeit stark braun erscheint. Mindestens 160% Jod, bezogen auf die verbrauchte Menge, sollen im Überschuß bleiben.[2]) Nach 2 Stunden ist die Reaktion bei Anwendung der *v. Hübl*schen Lösung meist beendet; der Sicherheit halber läßt man aber das Gemisch noch weitere 4 Stunden stehen. Nach dieser Zeit versetzt man mit 15—20 cm^3 Jodkaliumlösung, schwenkt um und fügt 300—500 cm^3 Wasser hinzu. Scheidet sich dabei ein roter Niederschlag von Quecksilberjodid aus, so war die zugesetzte Jodkaliummenge

[1]) Über die *Hübl*sche Chlorjodadditionsmethode und Vorschläge zu deren Verbesserung. Chemikerzeitung. Jg. **1895**. S. 1786 u. 1831.

[2]) *E. Richter*, Untersuchungen über die *Maumené*sche Probe und die Jodzahlen einiger Öle. Chem. Zentralblatt. 1907. II. S. 1935.

ungenügend. Man löst den Niederschlag, indem man unter kräftigem Schütteln eine weitere Menge Jodkalium zusetzt. Man läßt nun unter Umschwenken und zeitweiligem Schütteln so lange Hyposulfitlösung zufließen, bis die wässerige Flüssigkeit nur noch ganz schwach gelb erscheint. Dann setzt man Stärkekleister hinzu und weiter tropfenweise Hyposulfitlösung bis zum Verschwinden der Blaufärbung. Neben dieser Bestimmung stellt man einen blinden Versuch ohne Fett an. Aus der Differenz der bei beiden gebrauchten Natriumhyposulfitlösung berechnet man die Menge Jod und bezieht sie auf 100 Teile Fett.

Wys [1]) empfiehlt an Stelle der *Hübl*schen Lösung das folgende Gemisch. Man löst 9·4 *g* Jodtrichlorid und 7·2 *g* Jod auf dem Wasserbade getrennt in 95%iger Essigsäure. Die Lösungen werden alsdann in einen Literkolben gegossen und mit Essigsäure bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung ist auch nach den Erfahrungen von *Lewkowitsch*, der Eisessig empfiehlt, haltbar. Man verwendet sie wie die *Hübl*sche Lösung, doch braucht man vor dem Titrieren nur 10 cm^3 10%iger Jodkaliumlösung zuzusetzen. Das Fett löst man anstatt in Chloroform in Chlorkohlenstoff. Diese ebenso wie der Eisessig dürfen sich mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure nicht grün färben. Die Einwirkungsdauer ist eine viel kürzere als bei der *Hübl*schen und *Waller*schen Lösung. Es genügen für nicht trocknende Öle 10 Minuten bis 1/2 Stunde, bei trocknenden Ölen eine bis höchstens zwei Stunden. Die mit der *Wys*schen Lösung erhaltenen Zahlen fallen aber in manchen Fällen, besonders bei Anwesenheit von Cholesterin, bedeutend höher aus als die Zahlen nach *v. Hübl*. Der Überschuß an Jod, der unverbraucht bleibt, soll nicht mehr als 240% von der verbrauchten Menge betragen.

In derselben Weise wie bei den Fetten läßt sich die Jodzahl der Fettsäuren und des Cholesterins bestimmen. Das Verhalten der Lezithine scheint noch nicht untersucht zu sein.

		Jodzahl berechnet für Säure	Jodzahl berechnet für Triglyzerid
Ölsäure	$C_{18}H_{34}O_2$	90·07	86·20
Erucasäure	$C_{22}H_{42}O_2$	75·15	72·43
Linolsäure	$C_{18}H_{32}O_2$	181·42	173·58
Linolensäure	$C_{18}H_{30}O_2$	274·10	262·15
Ricinolsäure	$C_{18}H_{34}O_3$	85·23	81·76
Cholesterin	$C_{27}H_{45}(OH)$	65·8	

4. Bestimmung der Menge der flüchtigen, in Wasser löslichen und der in Wasser unlöslichen Fettsäuren.

Von Art und Menge der in einem Fette bzw. Organextrakte enthaltenen Fettsäuren kann man sich in verschiedener Weise eine Vorstellung zu verschaffen suchen.

Zur Prüfung auf flüchtige Fettsäuren verseift man die Fette, übersäuert mit Schwefelsäure, destilliert und titriert das Destillat. Hierbei kann man sich darauf beschränken, aus einer bestimmten Menge Fett unter gleichen Bedingungen stets nur eine bestimmte Menge abzudestillieren (Verfahren von *Reichert* und *Meissl*), oder man ersetzt das abdestillierte

[1]) *J. J. A. Wys*, Zur Jodadditionsmethode. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 31. S. 750 (1898).

Wasser und sucht die Gesamtmenge der flüchtigen Säuren durch Destillation zu gewinnen.

Oder man verseift eine bestimmte Menge Fett mit einer bestimmten Menge Kalilauge, setzt durch die, dem angewandten Alkali genau entsprechende Menge Salz- oder Schwefelsäure sämtliche Fettsäuren in Freiheit und bestimmt entweder die in Wasser unlöslichen Fettsäuren durch Wägung (Hehnerzahl) oder Titration, oder man bestimmt im Filtrat der festen Fettsäuren die in Wasser löslichen Fettsäuren durch Titrieren.

Destilliert man dieses Filtrat, so erhält man im Destillat die flüchtigen, in Wasser löslichen Fettsäuren.

*a) Reichert-Meissl*sche Zahl.

Die *Reichert-Meissl*sche Zahl gibt die Anzahl Kubikzentimeter Zehntelnormallauge an, welche zur Neutralisation der aus 5 *g* Fett nach dem *Reichert*schen Destillationsverfahren erhältlichen, mit Wasserdämpfen flüchtigen Fettsäuren erforderlich sind.

Zur Bestimmung der *Reichert-Meissl*schen Zahl werden 5 *g* Fett in einem Kölbchen von 200—350 cm^3 Inhalt abgewogen. Das Kölbchen wird auf das kochende Wasserbad gestellt. Zu dem geschmolzenen Fette läßt man aus einer Pipette unter Vermeidung des Einblasens 10 cm^3 einer alkoholischen Kalilauge (20 *g* Kaliumhydroxyd in 100 cm^3 Alkohol von 70 Volumprozent gelöst) fließen. Während man nun den Kolbeninhalt durch Schütteln öfter zerteilt, läßt man den Alkohol zum größten Teil weggehen; es tritt bald Schaumbildung ein, die Verseifung geht zu Ende und die Seife wird zähflüssig; sodann bläst man so lange in Zwischenräumen von etwa je $^1/_2$ Minute mit einem Handblasebalg unter gleichzeitiger schüttelnder Bewegung des Kolbens Luft ein, bis durch den Geruch kein Alkohol mehr wahrzunehmen ist. Man läßt nun sofort 100 cm^3 Wasser zufließen und erwärmt den Kolbeninhalt noch mäßig einige Zeit, während welcher der Kolben lose bedeckt auf dem Wasserbade stehen bleibt, bis die Seife vollkommen klar gelöst ist.

Zu der etwa 50° C warmen Lösung fügt man sofort 40 cm^3 verdünnte Schwefelsäure (1 Raumteil konzentrierte Schwefelsäure auf 10 Raumteile Wasser) und einige erbsengroße Bimssteinstückchen. Der auf ein doppeltes Drahtnetz gesetzte Kolben wird darauf mittelst eines gebogenen Glasrohres (von 20 *cm* Höhe und 6 *mm* lichter Weite), welches an beiden Enden stark abgeschrägt ist, mit einem Kühler (Länge des vom Wasser umspülten Teiles nicht unter 50 *cm*) verbunden und sodann werden genau 110 cm^3 in ein kubiziertes Kölbchen abdestilliert (Destillationsdauer nicht über $^1/_2$ Stunde). Das Destillat mischt man durch Schütteln und filtriert durch ein trockenes Filter in ein anderes Kölbchen mit Marke 100 cm^3 ab. Diese werden nach Zusatz von 3—4 Tropfen Phenolphtaleinlösung mit Zehntelnormal-Alkalilauge titriert. Bei jeder Versuchsreihe führt man einen blinden Versuch aus, indem man 10 cm^3 der alkoholischen Kalilauge mit soviel verdünnter Schwefelsäure versetzt, daß ungefähr eine gleiche Menge

14*

Kali wie bei der Verseifung von 5 *g* Fett ungebunden bleibt und sonst wie bei dem Hauptversuche verfährt. Die bei dem blinden Versuche verbrauchten Kubikzentimeter Zehntelnormal-Alkalilauge werden von den bei dem Hauptversuche verbrauchten abgezogen. Die so erhaltene Zahl ist die *Reichert-Meiss*lsche Zahl.[1])

Bei der technischen Untersuchung von Fetten verwendet man neuerdings meist das Verfahren von *Leffmann-Beam.*[2])

Verfahren von *Leffmann-Beam.* 5 *g* Fett werden in einem 300 cm^3 fassenden Erlenmeyerkolben mit 20 *g* Glyzerin vom spez. Gew. 1·26 und 2 cm^3 Natronlauge (erhalten durch Auflösen von 100 *g* Ätznatron in 100 cm^3 Wasser) unter beständigem Umschwenken über einer kleinen Flamme vorsichtig erhitzt. Die Mischung gerät alsbald in Sieden, das mit starkem Schäumen verbunden ist. Nach dem Verdampfen des Wassers, wozu in der Regel 3—8 Minuten langes Erhitzen erforderlich ist, tritt völlige Klärung der Flüssigkeit ein. Dies ist das Zeichen, daß die Verseifung beendet ist. Man läßt auf etwa 80° abkühlen und setzt 90 cm^3 Wasser von 80—90° hinzu. Aus der so erhaltenen, nötigenfalls durch einiges Erwärmen auf dem Wasserbade geklärten Seifenlösung scheidet man durch Zusatz von 50 cm^3 verdünnter Schwefelsäure (25 *g* konzentrierte Schwefelsäure in 1 *l* Wasser) die Fettsäuren ab und destilliert wie oben nach *Reichert-Meissl.*

b) Bestimmung der Gesamtmenge der flüchtigen in Wasser löslichen und der in Wasser unlöslichen Fettsäuren.

1. Bestimmung der in Wasser löslichen Fettsäuren.

Man verfährt zunächst so wie bei der Bestimmung der Verseifungszahl, d. h. man bringt 1·5—2 *g* des Fettes in einen *Erlenmeyer*schen Kolben und verseift mit 25 cm^3 der halbnormalen alkoholischen Kalilauge, setzt Phenolphtalein zu und läßt aus einer Bürette genau soviel Salzsäure zufließen, daß die Flüssigkeit für Phenolphtalein neutral reagiert. Man dampft nun auf dem Wasserbade den Alkohol vollkommen ab und löst die Seife in etwa 40 cm^3 Wasser. Zu dieser Seifenlösung wird eine weitere Menge von Salzsäure gesetzt, welche genau der bei der Verseifung gebundenen Menge Kalihydrat entspricht. Um nun die hierdurch in Freiheit gesetzten Fettsäuren, soweit sie in Wasser unlöslich sind, zur Abscheidung zu bringen, wird der Kolben mit einem Korken verschlossen, in dessen Bohrung ein U-förmiges, mit Wasser gefülltes Rohr steckt und auf dem Wasserbade vorsichtig erwärmt, bis sich die unlöslichen Fettsäuren an der Oberfläche angesammelt haben. Dann läßt man erkalten, filtriert durch ein nasses Filter und wäscht mit Wasser, bis dieses empfindliches blaues Lackmuspapier nicht mehr rötet, wozu etwa 100 cm^3 erforderlich sind. Zum Filtrat wird die im U-Rohr befindliche Flüssigkeit gegeben. Dann werden Filtrat und Waschwasser mit Phenolphtalein versetzt und mit Zehntelnormallauge titriert. Die verbrauchten Milligramme Kalihydrat sind das Maß für die in der angewendeten Menge enthaltenen löslichen Fettsäuren. Berechnet man die Menge auf 1 *g* Fett und zieht die gefundene Zahl von der Ver-

[1]) *G. Lebbin,* Amtliche Untersuchungsmethoden für Chemiker. Berlin 1907. S. 33.

[2]) Chem.-Ztg. Jg. **1896**. S. 607. — *L. Ubbelohde,* Handb. d. Chemie u. Technol. d. Öle u. Fette. Leipzig 1908. S. 220.

seifungszahl ab, so erhält man den Ausdruck für die Azidität der in Wasser unlöslichen Fettsäuren.

2. Um die Menge der mit Wasserdämpfen flüchtigen Fettsäuren zu bestimmen, werden 1·5—2 *g* des Fettes mit 25 *cm*³ halbnormaler alkoholischer Kalilauge verseift. Man neutralisiert unter Anwendung von Phenolphtalein mit verdünnter Schwefelsäure, entfernt den Alkohol durch Verdunsten und bringt die Seife mit Wasser in ein Erlenmeyerkölbchen von etwa 500 *cm*³ Inhalt. Dann werden 90 *cm*³ 10⁰/₀ige Schwefelsäure und einige Stückchen Bimsstein zugefügt. Der so beschickte Kolben wird mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen, durch dessen eine Bohrung der Fuß eines Tropftrichters, durch dessen andere ein entsprechend gebogenes Rohr geht, das in seinem aufsteigenden Schenkel eine Schutzkugel (siehe Kjeldahlbestimmung) hat und zur Verbindung mit dem absteigenden *Liebig*schen Kühler dient. Der Kolben wird auf dem Drahtnetz erhitzt. Nachdem 100 *cm*³ abdestilliert sind, werden durch den Tropftrichter 50 *cm*³ Wasser zugefügt, 50 *cm*³ abdestilliert, wieder 50 *cm*³ zugefügt usf., bis ein Tropfen des Destillats blaues Lackmuspapier nicht mehr rötet. Die gesamten Filtrate werden vereinigt, gemessen, durch ein trockenes Filter filtriert und unter Anwendung von Phenolphtalein titriert.

Dampft man das neutralisierte Destillat in einem gewogenen Gefäß zur Trockne, so läßt sich aus dem Gewicht des Trockenrückstandes und der Menge des zur Neutralisation gebrauchten Alkalis das mittlere Molekulargewicht der flüchtigen Fettsäuren[1]) berechnen.

5. Bestimmung der Menge der in Wasser unlöslichen Fettsäuren.

Das Fett wird in einem Bechergläschen zusammen mit einem Glasstabe gewogen. Von dem Öl oder dem durch Erwärmen verflüssigten Fett werden 3—4 *g* in einer Porzellanschale von 10 *cm* Durchmesser abgegossen. Das genaue Gewicht wird durch Zurückwiegen des Becherglases ermittelt. Das Fett in der Porzellanschale wird mit 1 bis 2 *g* Kalihydrat und 50 *cm*³ Alkohol versetzt und unter öfterem Umrühren auf dem Wasserbad erwärmt, bis das Fett vollständig verseift ist. Die Seifenlösung wird bis zur Sirupdicke verdampft, der Rückstand in 100 bis 150 *cm*³ Wasser gelöst und mit Salzsäure oder Schwefelsäure angesäuert. Man erhitzt, bis sich die Fettsäuren als klares Öl an der Oberfläche angesammelt haben und filtriert durch ein vorher bei 100⁰ getrocknetes und im geschlossenen Wiegegläschen gewogenes Filter aus sehr dichtem Papier. Um ein trübes Durchlaufen der Flüssigkeit zu vermeiden, füllt man das Filter zunächst zur Hälfte mit heißem Wasser an und gießt erst dann die Flüssigkeit mit den Fettsäuren darauf. Man wäscht mit siedendem Wasser, bis blaues Lackmuspapier vom Filtrat nicht mehr gerötet wird, wobei man stets dafür sorgt, daß das Filter nicht vollständig abläuft. Nach dem Auswaschen wird der Trichter

[1]) Vgl. *K. Farnsteiner,* Chem. Revue über die Fett- und Harzindustrie. 1898. Heft 10.

mit dem Filter in ein mit kaltem Wasser gefülltes Becherglas gestellt, so daß (wenn möglich) die Fettsäuren auf der Flüssigkeit schwimmend erstarren. Hierauf läßt man das Wasser vorsichtig ablaufen, bringt das Filter mit den Fettsäuren in das Wiegegläschen zurück, trocknet bei 100° C erst 2 Stunden, wiegt und trocknet noch weitere 1—2 Stunden. Das Gewicht, auf 100 *g* Fett bezogen, ist die *Hehner*sche Zahl. Löst man das Fett unter Erwärmen in Alkohol und titriert es nach Zusatz von Phenolphtalein mit Halbnormalkalilauge bis zur bleibenden Rotfärbung, so kann man durch Vergleich mit der Verseifungszahl feststellen, wieviel sich von den Säuren des Fettes in Wasser gelöst haben. Wenn man vor der Titrierung gewogen hat, so kann man aus der gefundenen Azidität auch erkennen, ob das Gemisch wesentlich aus den gewöhnlichen höheren Fettsäuren besteht oder ob ihnen noch andere neutrale Stoffe, besonders hochmolekulare Alkohole, Oxyfettsäuren u. a. beigemengt sind.

6. Acetylzahl.

Die Acetylzahl der Fette gibt die Anzahl von Milligrammen Kalihydrat an, die erforderlich ist, um die Menge Essigsäure zu neutralisieren, welche bei der Verseifung eines Grammes des acetylierten Fettes abgespalten wird.

Sie ist ein Maß für die in einem Fette in freiem Zustande vorhandenen Hydroxylgruppen, die sowohl in Oxysäuren wie in hochmolekularen Alkoholen enthalten sein können.

Wie die Fette so kann man auch das aus ihnen durch Verseifung gewonnene Fettsäuregemisch acetylieren und seine Acetylzahl bestimmen.

Ein Vergleich der Acetylzahl der Fette und der aus ihnen gewonnenen Fettsäuregemische gibt einen Hinweis auf die Menge der Hydroxylgruppen, welche in Oxysäuren oder Alkoholen in dem Fette frei und gebunden enthalten sind.[1] Störend kann bei der Bestimmung der Acetylzahl von Fetten ihr Gehalt an flüchtigen Fettsäuren sein, welcher, wenn die Fettsäuren in wasserunlöslichen Verbindungen enthalten sind, die Acetylzahl zu hoch erscheinen läßt.

Die Bestimmung der Acetylzahl wurde zuerst von *Benedikt* empfohlen und wird nach *Lewkowitsch* in folgender Weise ausgeführt.

Bestimmung der Acetylzahl: 5 *g* des Fettes bzw. des Fettsäuregemisches werden mit 5 *g* doppeltgeschmolzenem essigsauren Natrium und 15—20 *g* Essigsäureanhydrid in einem Erlenmeyerkölbchen mit eingesetztem kleinen Trichter oder am Rückflußkühler eine halbe bis zwei Stunden lang zum schwachen Sieden erhitzt. Dann gießt man das Produkt in ein Becherglas mit Wasser und erhitzt bis nahe zum Sieden. Sollte sich hierbei, wie dies bei Gegenwart von Lezithin der Fall ist, das acetylierte Produkt nicht gut abscheiden, so erhitzt man nach Zusatz von etwas Kochsalz im Kohlensäurestrom.[1] Das abgeschiedene Öl gießt man durch ein

[1] *Y. Nukada*, Zur Kenntnis des tierischen Fette und des Petrolätherextraktes der Leber. Biochem. Zeitschr. Bd. 14. S. 419 (1908).

nasses Filter und wäscht mit warmem Wasser. [Verarbeitet man größere Mengen Fett, so erhitzt man im Kohlensäurestrom und entfernt die unter der Ölschicht befindliche saure Flüssigkeit mittelst Hebers.] Das gewaschene Öl löst man in Äther, schüttelt zur Entfernung etwaiger Reste von Essigsäure noch einige Male mit Wasser und läßt die ätherische Flüssigkeit durch ein trockenes Filter in ein gewogenes Kölbchen fließen, aus dem man den Äther abdestilliert. Den Rückstand trocknet man im Leuchtgasstrome. Aus dem Kölbchen bringt man eine Probe von 1·5—2 *g* in ein anderes Kölbchen, wägt das erste Kölbchen zurück und bestimmt in der abgenommenen Probe 1. die Azidität nach S. 205, 2. die Verseifungszahl (Ätherzahl) nach S. 205, 3. die Menge der löslichen Fettsäuren nach 4, b_1 — *Lewkowitschs* „Filtrationsverfahren" — oder nach b_2 — „Destillationsverfahren" —. Die nach ersterem erhaltenen Werte sind etwas höher als die nach letzterem gewonnenen.[1] Die Azidität des Filtrats bezw. Destillats, ausgedrückt in Milligrammen Kalihydrat und bezogen auf 1 *g* Fett, ist die Acetylzahl.

Acetylzahlen.

Acetat des	Formel	Molekulargewicht	Acetylzahl
Cetylalkohols	$C_{16}H_{33}O.C_2H_3O$	284	197·5
Octadecylalkohols	$C_{18}H_{37}O.C_2H_3O$	312	179·8
Cerylalkohols	$C_{26}H_{53}O.C_2H_3O$	424	132·3
Myricylalkohols	$C_{30}H_{61}O.C_2H_3O$	480	116·9
Cholesterins	$C_{27}H_{45}O.C_2H_3O$	428	130·8
Glyzerins	$C_3H_5(O.C_2H_3O)_3$	218	772·0

7. Bestimmung des Glyzerins.

Eine Bestimmung des Glyzerins ist notwendig, wenn man erfahren will, wie weit ein fettähnliches Gemisch aus echtem Fett besteht.

a) Bestimmung des Glyzerins durch Oxydation mit Permanganat.

1 Molekül Glyzerin liefert genau 1 Molekül Oxalsäure und 1 Molekül Kohlensäure, wenn man es in stark alkalischer Lösung mit Permanganat oxydiert: $C_3H_8O_3 + 3O_2 = C_2H_2O_4 + CO_2 + 3H_2O$.

Dieses Verfahren kann man zur Bestimmung des Glyzerins benutzen, wenn bei der Verseifung des Fettes neben dem Glyzerin keine anderen in Wasser löslichen Stoffe entstehen, welche unter den erwähnten Bedingungen Oxalsäure liefern.

Verfahren von *Benedikt-Zsigmondy* in der Modifikation von *C. Mangold.*[2] 2—4 *g* des Fettes werden mit Kalilauge und reinem

[1] *Y. Nukada,* a. a. O.

[2] Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **31**. S. 718 (1892).

Methylalkohol verseift. Der Methylalkohol wird verdunstet, die Seife in heißem Wasser gelöst und unter Erwärmen mit verdünnter Salzsäure zersetzt. Erwartet man, daß die Fettsäuren beim Abkühlen flüssig bleiben, so setzt man ihnen etwas Paraffin hinzu. Man läßt erkalten, filtriert in einen Literkolben und wäscht die Seifen sorgfältig. Zu dem Filtrat, das bei einem Gehalt von 0·2—0·4 *g* Glyzerin etwa 300 *cm*³ betragen soll, setzt man 10 *g* Kalihydrat und in der Kälte unter Schütteln soviel einer 5%igen Permanganatlösung, als der 1½fachen Menge der nach der Theorie für die Oxydation des Glyzerins nötigen Menge (6·87 Teile Kaliumpermanganat auf 1 Teil Glyzerin) entspricht. Man läßt alsdann eine halbe Stunde lang bei gewöhnlicher Temperatur stehen und setzt unter Vermeidung eines größeren Überschusses Wasserstoffsuperoxydlösung zu, bis die Flüssigkeit über dem Niederschlag farblos geworden ist. Alsdann füllt man auf 1000 *cm*³ auf, schüttelt um und filtriert 500 *cm*³ durch ein trockenes Filter. Das Filtrat wird eine halbe Stunde lang erhitzt, um alles Wasserstoffsuperoxyd zu zerstören. Man kühlt dann auf 60° ab, säuert mit Schwefelsäure an und titriert mit entsprechend eingestellter Permanganatlösung, oder man säuert mit Essigsäure an, erhitzt zum Sieden und fällt mit 10 *cm*³ einer 10%igen Calciumchlorid- oder Calciumacetatlösung zunächst die Oxalsäure aus. Der Niederschlag wird abfiltriert. Das Calciumoxalat wird nun nicht gravimetrisch bestimmt, weil es mit Kieselsäure verunreinigt sein kann, sondern alkalimetrisch. Man glüht, löst den Rückstand in einer überschüssigen Menge einer titrierten Salzsäure und titriert den Überschuß mit titrierter Kalilauge unter Anwendung von Methylorange oder Lakmoid zurück. 112·2 Teile Kalihydrat entsprechen 92 Teilen Glyzerin.

b) Bestimmung nach dem Acetinverfahren.

Man sucht nach *Lewkowitsch* möglichst reines Glyzerin aus dem Fette zu gewinnen, acetyliert es und berechnet die Menge des Glyzerins aus der bei der Verseifung des Triacetins gebundenen Kalilauge.

c) Bestimmung des Glyzerins durch Überführung in Isopropyljodid nach *S. Zeisel-Fanto.*[1])

Das Verfahren schließt sich in seiner Ausführung an die Methode der Methoxyl- (Alkoxyl-) Bestimmung von *Zeisel* an. Hier wie dort erfährt das Objekt der Analyse unter der Einwirkung kochender, wässeriger Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1·7 eine Umwandlung in ein flüchtiges Jodalkyl, dessen Dampf, von begleitendem Jod und Jodwasserstoff befreit, in alkoholische Silbernitratlösung eintritt. Mit dieser setzt es sich zur äquivalenten Menge Jodsilber um, welches zur Wägung gelangt

[1]) Ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Methoxyl. Monatshefte f. Chem. Bd. 6. S. 989 (1885). — *M. Z. Stritar,* Zur Methoxyl- und Glyzerinbestimmung. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 42. S. 579. — *F. Tangl* und *St. Weiser,* Über den Glyzeringehalt des Blutes. *Pflügers* Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **115**. S. 155 (1906).

oder auch maßanalytisch bestimmt werden kann. Das aus Glyzerin durch überschüssige Jodwasserstoffsäure in der Hitze gebildete Endprodukt ist Isopropyljodid

$$C_3H_5(OH)_3 + 5HJ = {CH_3 \atop CH_3}\!\!>\!CHJ + 3H_2O + 2J_2.$$

Für die Bestimmung ist der beistehend in etwa $^1/_6$ der Naturgröße abgebildete Apparat nötig (geliefert von P. Haack, Wien, IX$_3$, Garelligasse 4) (Fig. 16).

Beschreibung des Apparates. Er besteht aus dem Siedekolben *A*, dem Steigrohr *B* mit Aufsatz (Waschapparat) und Stopfen *B*, dem Vorstoß und den beiden Vorlagen *C* und *D*. Das etwa 40 cm^3 fassende Siedekölbchen trägt angeschmolzen ein gebogenes, nahe der Schmelzstelle auf mindestens 1 *mm* lichten Durchmesser verengtes Rohr *a* zum Einleiten des Kohlensäuregases. — Der Waschapparat, ähnlich dem *Schrötter*schen Exsikkatoraufsatze gebaut, besteht aus dem die Fortsetzung des 10 *cm* langen und im Lichten 7—8 *mm* weiten Steigrohres umschließenden Mantel mit seitlichem Ansatzrohr und dem bis knapp auf den Boden des Mantelgefäßes reichenden, dort etwas eingezogenen Rohrstopfen. — Die Abmessungen des Aufsatzes sind derart gewählt, daß er anstandslos mit mindestens 5 cm^3 Waschflüssigkeit gefüllt werden kann. — Die Form des Vorstoßes ist aus der Zeichnung zu ersehen; das untere Ende des ersten Einleitrohres ist etwas erweitert, um Verstopfung durch angesetztes Jodsilber zu verhindern. Die erste Vorlage, ein Erlenmeyerkolben mit weitem Halse, faßt bis zu einer etwa in halber Höhe angebrachten Marke 45 cm^3; die zweite, im allgemeinen nicht gerade notwendig aber empfehlenswert, braucht nicht mehr als 5 cm^3 zu fassen. Die einzelnen Teile des Apparates sind durch sorgfältig hergestellte und mit Wasser gedichtete Schliffe verbunden, die zur Sicherheit noch mit an den angeschmolzenen Hörnchen sitzenden Drahtspiralen zusammengehalten werden.

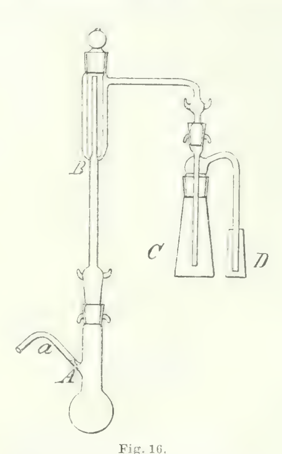


Fig. 16.
Apparat zur Glyzerinbestimmung nach *Zeisel-Fanto*.

Erforderliche Reagenzien. 1. Jodwasserstoff: spezifisches Gewicht 1·9. 2. Silberlösung: 40 *g* geschmolzenes Silbernitrat werden in 100 cm^3 Wasser gelöst und mit reinem Alkohol auf 1 *l* aufgefüllt. Sie ist nach 24 Stunden und wenn nötig noch einmal vor dem Gebrauch zu filtrieren. 3. Roter Phosphor, mit Schwefelkohlenstoff, Äther Alkohol und Wasser gut gewaschen. Etwa 0·5 *g* in 5 cm^3 einer 10%igen Natriumarsenitlösung aufgeschwemmt, kommen in den Waschapparat *B*.

Ausführung der Bestimmung: 5 cm^3 der zu untersuchenden wässerigen Glyzerinlösung mit höchstens 5% Glyzerin, die frei sein muß von gewissen Beimengungen (Schwefelverbindungen, die beim Kochen mit JH Schwefelwasserstoff oder Isopropylmerkaptan geben, Alkohole, Äther und Ester), werden unmittelbar nach Zusatz von 15 cm^3 Jodwasserstoffsäure und einem Splitter von gebranntem Ton in das Siedekölbchen gebracht. Nachdem in den Waschapparat die Phosphoremulsion, in die erste

Vorlage 45 *cm*³, in die zweite 5 *cm*³ der Silberlösung gebracht und die Teile des Apparates sorgfältig miteinander verbunden sind, wird durch das Seitenrohr des Siedekölbchens durch Wasser bzw. Natriumbikarbonat gewaschene Kohlensäure — etwa drei Blasen in der Sekunde — durchgeleitet und das Kölbchen vorsichtig zum Sieden erhitzt. Die Jodwasserstoffsäure soll eben deutlich sieden, so daß sich der Siedering etwa bis zur halben Höhe des Steigrohrs erhebt. Bald trübt sich die Silberlösung in der ersten Vorlage, es scheidet sich eine deutlich kristallinische, weiße Verbindung von Ag J und $AgNO_3$ aus. Diese Verbindung färbt sich oft, namentlich wenn größere Mengen Isopropyljodid in die Silberlösung gelangen, durch nur teilweise Umwandlung von Ag J gelb. Schließlich klärt sich die Flüssigkeit über dem Niederschlage.

Ist die Operation nach 1—3 Stunden beendet, so kommt der Niederschlag samt Mutterlauge in ein etwa 600 *cm*³ fassendes Becherglas. Man gießt mit dem Spülwasser auf etwa 450 *cm*³ auf, setzt 10—15 Tropfen verdünnter Salpetersäure zu und läßt eine halbe Stunde auf einem kochenden Wasserbade stehen. Hierbei wird die Doppelverbindung von Silbernitrat-Silberjodid zersetzt. Der Niederschlag wird auf einen mit Asbest beschickten Goochtiegel gebracht, mit Wasser und Alkohol gewaschen, bei 120—130° C getrocknet und dann gewogen.

8. Bestimmung der in einem Fette enthaltenen hochmolekularen Alkohole („Unverseifbares").

Wenn man Fette oder Ätherextrakte von Organen verseift und die Seife mit Mineralsäuren zerlegt, so erhält man ein in Wasser unlösliches Gemisch der Fettsäuren, welchen in wechselnder Menge Cholesterin, Phytosterin und ähnliche hochmolekulare Alkohole beigemengt sind. Die Trennung der hochmolekularen Alkohole von den Fettsäuren ist im Prinzip einfach: Man führt die Säuren in die Seifen über und entzieht mittelst Äther oder Petroleumäther die Alkohole. Man stößt hierbei aber auf zwei Schwierigkeiten. Der Äther oder Petroläther bildet mit den Seifen leicht Emulsionen, die sich mitunter nur sehr schwer trennen lassen. Und weiter nehmen Äther und Petroläther auch Seifen auf. Am besten ist wohl das folgende, besonders auch in der Technik bewährte Verfahren (siehe auch S. 248).

Bestimmung des „Unverseifbaren" nach *M. Hönig* und *G. Spitz*.[1])

7—10 *g* Fett werden mit 20—25 *cm*³ konzentrierter alkoholischer Kalilösung und ebensoviel Alkohol 2 Minuten lang (bei Anwesenheit größerer Mengen schwer oder unverseifbaren Fettes 5—10 Minuten lang) am Rückflußkühler gekocht, hierauf 30—40 *cm*³ Wasser zugefügt und nochmals aufgekocht. Nach dem Abkühlen wird die Seifenlösung in einen Scheidetrichter gebracht, das Kölbchen mit 50%igem Alkohol und darauf mit

[1]) Untersuchung von Gemengen von unverseifbarem und verseifbarem Fette. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **31**. S. 477 (1892).

etwa 50 *cm*³ Petroläther (Siedepunkt 50—70°) in den Scheidetrichter hinein ausgespült, der Inhalt des Scheidetrichters kräftig durchgeschüttelt und dann der Ruhe überlassen. Der Petroläther trennt sich rasch und scharf von der alkoholischen Seifenlösung. Letztere wird abgelassen, der Petroläther mit je 10—15 *cm*³ 50%igem Alkohol 2—3mal gewaschen; die alkoholischen Waschflüssigkeiten werden mit der ursprünglichen Seifenlösung vereinigt. Der Petroläther wird sodann in ein trockenes, tariertes Kölbchen entleert, und das Ausschütteln der alkoholischen Seifenlösung mit Petroläther so oft wiederholt, bis der Petroläther auf Papier keinen Fettfleck hinterläßt. Jeder der Petrolätherauszüge wird zur Entfernung aufgenommener Seife in der angegebenen Weise mit 50%igem Alkohol gewaschen. In der Regel genügen drei Ausschüttelungen mit Petroläther. Die gewaschenen vereinigten Petrolätherauszüge werden abdestilliert, wobei zur Vermeidung des Stoßens ein gewogenes Bimssteinstückchen zugesetzt werden kann. Die letzten Reste des Petroläthers werden aus dem Verdunstungsrückstand durch Erwärmen und Ausblasen entfernt. Dann wird der Rückstand gewogen. Statt zu schütteln, kann man auch kontinuierlich extrahieren (siehe S. 201).

Gehalt an hochmolekularen Alkoholen.[1])

Spermacetiöl	37—41%
Döglingtran	31·7—42·6%
Carnaubawachs	55%
Wollfett	43—52%
Bienenwachs	52·0—55·6%
Walrat	51%

Reaktionen als Vorproben bei der qualitativen Untersuchung der Fette etc.

1. Elaidinprobe.

Die Elaidinprobe beruht auf der Erfahrung, daß Ölsäure in Berührung mit salpeteriger Säure sich in die ihr stereoisomere feste Elaidinsäure verwandelt.

Nach *Finkener*[2]) fügt man zu 10 *cm*³ Olivenöl in einem verschließbaren Reagenzglase 1 *cm*³ Salpetersäure von 1·4 spez. Gew. und 0·4 *g* metallisches Kupfer in etwa 1 *mm* starken Spänen. Die Einwirkung der Salpetersäure auf das Kupfer beginnt sofort unter merklicher Temperaturerhöhung und ist nach einer halben Minute wesentlich beendet. Schüttelt man den Inhalt des Reagenzglases durcheinander, so werden die roten Dämpfe, die sich oberhalb des Öls befinden, absorbiert und das Öl, auf

---

[1]) *L. Ubbelohde*, Handbuch der Chemie und Technologie der Öle und Fette. S. 260. Leipzig 1908.

[2]) *Finkener*, Anstellung der Elaidinreaktion. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 27. S. 534 (1888).

10—12° abgekühlt, erstarrt innerhalb 30 Minuten zu einer vollständig festen Masse. Baumwollensamenöl, Mohnöl, Leinöl erstarren nicht, andere Öle liefern mehr oder weniger weiche Massen.[1])

2. Eintrocknungsvermögen.

Man bringt einen Tropfen Öl auf eine Glasplatte und läßt diese an der Luft bei Zimmertemperatur oder bei 50° liegen. 0·1 *g* Öl auf eine Glasplatte von 7 cm^2 aufgestrichen, erfordern bei 50° C zum Eintrocknen: bei Leinöl etwa 12 Stunden, Maisöl 18, Baumwollensamenöl 21, Curcasöl 24—30, Rüböl 48 Stunden, Olivenöl über 13 Tage.[2])

Die Eintrocknung wird beschleunigt, indem man dem Öl fein verteiltes Blei- oder Kupferpulver zusetzt.

Die hierbei erfolgende Sauerstoffaufnahme hat man in verschiedener Weise zu bestimmen gesucht.

Livaches Probe: 1 *g* Bleipulver (durch Ausfällen eines Bleisalzes mit Zink dargestellt) wird auf einem ziemlich großen Uhrglase in dünner Schicht ausgebreitet und abgewogen, wonach man auf dasselbe mit einer Pipette nicht mehr als 6—7 *g* des zu untersuchenden Öles tropfen läßt mit der Vorsicht, daß man jeden Tropfen auf eine andere Stelle des Bleis (oder Kupferpulvers) fallen läßt und dafür Sorge trägt, daß die Tropfen nicht ineinander fließen. Man läßt alsdann das Uhrglas bei gewöhnlicher Temperatur, dem Licht ausgesetzt, stehen und bestimmt die Gewichtszunahme.

Auch die Erwärmung, welche eintritt, wenn man die Öle mit konzentrierter Schwefelsäure mischt (*Maumenés* Probe) oder wenn man Chlorschwefel oder Brom auf sie einwirken läßt, hat man zur Charakterisierung der Öle benutzt.

3. Reaktionen auf Sesamöl.

Baudouins Probe auf Sesamöl. Man bringt 0·1 cm^3 einer 2%igen alkoholischen Furfurollösung in ein Probierrohr, setzt 10 cm^3 des Öls oder des aus ihm gewonnenen Fettsäuregemisches und 10 cm^3 Salzsäure (spez. Gew. 1·19) zu, schüttelt das Gemisch kräftig und läßt absitzen. Bei Anwesenheit von Sesamöl, selbst wenn dessen Menge weniger als 1% beträgt, färbt sich die salzsaure Lösung tiefrot.

*Soltsiens*che Reaktion auf Sesamöl. 2—3 Vol. des Fettes werden in dem doppelten Volumen Benzin (Siedepunkt 70—80°) gelöst und mit 3 Vol. salzsaurer Zinnchlorürlösung (*Bettendorfs* Reagenz, herzustellen durch Sättigen konzentrierter Zinnchlorürlösung mit Salzsäuregas) bis zur gleichmäßigen Mischung durchgeschüttelt und in ein Wasserbad von 40° eingetaucht. Nach dem Absetzen der Zinnchlorürlösung wird das Reagenzglas in Wasser von etwa 80° nur bis zur Hälfte der Zinnchlorürlösung einge-

---

[1]) Vgl. *A. Lidow*, Über die Elaidinreaktion. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **26**. Ref. S. 97 (1893). — *K. Farnsteiner*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel. 1899. S. 4.

[2]) *Archbutt* zitiert nach *J. Lewkowitsch*, Handbuch d. chem. Technol. u. Analyse d. Öle, Fette und Wachse. Braunschweig 1905. I. S. 333.

senkt, so daß ein Sieden des Benzins möglichst vermieden wird. Man erwärmt so lange, bis (bei Gegenwart von Sesamöl) die Rotfärbung der Zinnchlorürlösung nicht mehr zunimmt.

Der Träger der *Soltsien*schen Reaktion ist nicht identisch mit demjenigen der *Baudouin*schen Reaktion.

4. Reaktion auf Baumwollensamenöl.

Halphens Reaktion: 1—3 *cm*³ des Öles werden in dem gleichen Volumen Amylalkohol gelöst. Hierzu werden 1—3 *cm*³ Schwefelkohlenstoff, welche 1% Schwefelblumen in Lösung enthalten, zugesetzt. Das Reagenzrohr, welches das Gemisch enthält, wird dann in siedendes Wasser gebracht und darin einige Zeit gehalten. Der Schwefelkohlenstoff verdampft und im Laufe von 5—15 Minuten gibt Baumwollensamenöl eine tiefrote Färbung.

Gewinnung von Triglyzeriden aus Fetten.

Die Trennung der in den Fetten enthaltenen Triglyzeride durch fraktionierte Kristallisation aus geeigneten Lösungsmitteln unter Anwendung bestimmter Temperaturen führt nur in ganz bestimmten Fällen zu einem Ziele. Sie erfordert meist größere Mengen Substanz, ist mühsam und für die Bearbeitung biologischer Fragen meistens überflüssig.

In den Fetten bildet das Triolein das Lösungsmittel für die anderen Triglyzeride. Erwärmt man ein bei Zimmertemperatur hartes Fett auf eine etwas höhere Temperatur, so geht ein gewisser Anteil des Gesamtfettes in Lösung, der sich durch Abpressen entfernen läßt. Kühlt man ein Öl auf eine niedrigere Temperatur ab, so scheiden sich häufig festere Anteile aus, die man durch Abfiltrieren gewinnen kann.

Diese Fraktionen lassen sich durch geeignete Lösungsmittel weiter zerlegen. Aber selbst wenn man z. B. Hammelfett 32mal aus Äther umkristallisiert, gelingt es nicht, das Tristearin vollkommen vom Tripalmitin zu trennen. Ebensowenig lassen sich durch Umkristallisieren der Fette aus Alkohol, Äther, Benzol und Amylalkohol oleinfreie Kristallisationen erhalten.

Eine Abtrennung der oleinhaltigen Anteile gelingt jedoch, wenn man die Substanz mit *Hübl*scher Jodlösung behandelt und wiederholt aus Benzol und Alkohol, dann aus Äther umkristallisiert.

Man erhält so aus Hammel- und Rinderfett Fraktionen von gleichbleibender Löslichkeit, Kristallisation und Zusammensetzung, sowie gleichbleibendem Schmelzpunkt, die in ihren Eigenschaften synthetischem α-Palmitodistearin entsprechen. Aus Talg ließ sich durch fraktionierte Kristallisation auch ein Oleodipalmitin, aus gewissen Pflanzenfetten ein Oleodistearin darstellen.[1]) Bei solchen fraktionierten Kristallisationen hat man mit der Bildung eutektischer Gemische zu rechnen.

---

[1]) *H. Kreis* und *A. Hafner*, Über natürlich vorkommendes und synthetisches Palmitodistearin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 36. S. 1126 (1903). — *J. Klimont*, Monatshefte f. Chem. Bd. 26. S. 563 (1905).

Trilaurin kann man aus Lorbeeröl durch Alkohol abscheiden. Es wird durch Umkristallisieren aus Alkohol und Destillation im absoluten Vakuum gereinigt (Schmelzpunkt 45°). Ähnlich wird aus Muskatbutter Trimyristin (Schmelzpunkt 45°) gewonnen.[1])

Trennung und Charakterisierung der Fettsäuren.

1. Trennung der in Wasser unlöslichen gesättigten Fettsäuren von den ungesättigten Fettsäuren.

Bevor man zur Trennung der Fettsäuren schreitet, hat man sich durch Bestimmung der Jodzahl darüber unterrichtet, ob das Fettsäuregemisch ungesättigte Säuren enthält. Hierbei weist zugleich die Höhe der Jodzahl darauf hin, ob neben Ölsäure auch wesentliche Mengen von Säuren mit mehr als einer doppelten Bindung zu erwarten sind.

Fehlen ungesättigte Fettsäuren oder sind sie nach der im folgenden zu erwähnenden Methode abgeschieden worden, so untersucht man auf Stearinsäure und Palmitinsäure sowie Laurin- und Myristinsäure, wie weiter unten (S. 226 ff.) beschrieben wird.

Sind ungesättigte Fettsäuren vorhanden, so trennt man diese durch die verschiedene Löslichkeit ihrer Blei- und Baryumsalze von den gesättigten Fettsäuren.

Die Bleisalze der Ölsäure, der Leinölsäuren und der Rizinolsäure sind leicht löslich in Äther und Benzol.[2]) Von palmitinsaurem Blei sind in 100 *cm*³ einer absolut-ätherischen Lösung 0·0184 *g*, von stearinsaurem Blei 0·0148 *g* enthalten.[3]) In Benzol lösen sich palmitinsaures und stearinsaures Blei nur beim Erwärmen. Beim Abkühlen scheiden sie sich fast vollständig wieder aus.

Auch ölsaures Kupfer, Mangan und Eisen sind in Äther löslich, dagegen ist Silberoleat nahezu unlöslich.

Calciumoleat ist in Alkohol und Äther löslich.

Baryumoleat ist löslich in Äther, sehr schwer in kochendem Alkohol, fast unlöslich in Benzol. Es löst sich in Benzol, welches nur 5% oder auch etwas weniger 95%igen Alkohol enthält, beim Erwärmen sehr leicht auf und scheidet sich beim Erkalten der Lösung kristallinisch ab. Ähnlich verhält es sich zu Chloroform und Petroläther.[4])

Von Calciumpalmitat lösen sich in 100 Teilen absolutem Alkohol bei 20° C 0·0103 Teile, von Baryumpalmitat 0·0035 Teile, Calcium- und Baryumstearat sind in Alkohol fast unlöslich.

---

[1]) *F. Krafft*, Über Reindarstellung hochmolekularer Säureester durch Vakuumdestillation. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 4344 (1903).

[2]) *A. Farnsteiner*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1898. S. 392.

[3]) *A. Lidow*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **26**. Ref. S. 97 (1893).

[4]) *L. Schön*, Über Nichtvorkommen der Hypogaeasäure in Erdnußöl. Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **244**. S. 265 (1888)

Myristinsaurer Baryt ist sehr wenig löslich in Wasser und Alkohol, laurinsaurer Baryt löst sich in Alkohol im Verhältnis 1 : 1000.

Die Baryumsalze von Linol- und Linolensäure sind in Alkohol, Benzol, Petroläther und Äther löslich.

Die Baryum-, Blei- und Silbersalze der Elaidinsäure sind in Alkohol und Äther sehr schwer löslich.[1]

Die Fettsäuren bilden in bezug auf ihre Löslichkeit also folgende Gruppen:

a) Fettsäuren, deren Bleisalze unlöslich in Äther sind und in kaltem Benzol (Palmitinsäure, Stearinsäure);

b) Fettsäuren, deren Bleisalze löslich in Äther sind und in kaltem Benzol, und zwar:

α) Baryumsalze in Alkohol und kaltem Benzol unlöslich (Ölsäure).

β) Baryumsalze in Alkohol und Benzol löslich (Linolsäure, Linolensäure).

Eine Trennung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren ist hiernach möglich sowohl durch Behandlung der Bleisalze mit Äther wie mit Benzol. Auf dem Verhalten zu Benzol beruht ein von *Farnsteiner*[2]) angegebenes Verfahren. Für präparatives Arbeiten geeigneter ist das ältere Verfahren von *Varrentrapp*, welches auf der verschiedenen Löslichkeit der Bleisalze in Äther beruht, und zwar nach der Vorschrift von *Fahrion.*

Trennung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren nach *Varrentrapp-Fahrion.* In einem 300 *cm*³ fassenden Erlenmeyerkolben werden 10 *g* Fett mit 60 *cm*³ alkoholischer Natronlauge (etwa 3 *g* NaOH enthaltend) unter Umschütteln solange gelinde erwärmt, bis völlige Verseifung eingetreten ist. Man fügt Phenolphtalein hinzu und neutralisiert mit starker Essigsäure. Die Lösung wird mit 50 *cm*³ Wasser verdünnt und mit einer neutralen Lösung von 10 *g* Bleiacetat in 100 *cm*³ 50%igem Alkohol gefällt. Man erwärmt auf dem Wasserbade, bis sich die überstehende Flüssigkeit völlig geklärt hat und läßt erkalten, worauf sie sich ohne Filtration abgießen läßt. Die Bleiseife befreit man möglichst vom Wasser (nach *Hazura* durch Pressen zwischen sauberen Holzplatten oder durch Trocknen im Leuchtgasstrome) und schüttelt, wenn nötig, unter ganz schwachem Erwärmen solange mit 100 *cm*³ Äther, bis sich die Brocken verteilt und die Bleisalze der festen Fettsäuren als weicher flockiger Niederschlag abgeschieden haben. Nach dem Absitzen derselben gießt man die ätherische Lösung durch ein trockenes Faltenfilter in einen Scheidetrichter und schüttelt sie zur Zersetzung der gelösten Bleisalze mit verdünnter Salzsäure. Nach Klärung der Schichten zieht man die untere, wässerige Schicht ab, die ätherische gießt man in einen zweiten Scheidetrichter, wo sie mit wässeriger Natronlauge (etwa 2 *g* enthaltend) geschüttelt wird, welcher man soviel Alkohol (höchstens 20%) zufügt, daß eine scharfe

[1]) *K. Farnsteiner*, Versuche über den Nachweis und die Trennung einzelner ungesättigter Säuren der Fette. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußm. 1899. S. 9.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel. 1898. S. 290.

Trennung der Schichten eintritt. Die ungesättigten Fettsäuren gehen in die alkalische Lösung über, während das Unverseifbare in der ätherischen Lösung zurückbleibt. Die erstere Lösung wird in den, unterdessen gereinigten ersten Scheidetrichter zurückgebracht, mit Wasser stark verdünnt, mit Salzsäure angesäuert und mit Petroläther geschüttelt.

Der Petroläther wird bei Anwesenheit von Säuren der Linol- und Linolenreihe in einer Kohlensäure- oder Wasserstoffatmosphäre abdestilliert.

Trennung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren nach *Farnsteiner.* Aus dem verseiften Fett werden, wie oben beschrieben, die Fettsäuren als Bleisalze abgeschieden. Die Bleiseifen werden in Benzol unter mäßigem Erwärmen gelöst, und zwar nimmt man für die aus 1 *g* Fett erhaltenen Seifen 50 cm^3 Benzol. Man läßt dann die Lösung bei gewöhnlicher Temperatur etwa 15 Minuten stehen, um eine grobkristallinische Ausscheidung zu erzielen und kühlt sodann die Flüssigkeit etwa 2 Stunden auf 8—12° ab. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird nach *J. Lewkowitsch* am besten mittelst eines Trichterrohres mit Glockentrichter abgehebert, der mit feinem Linnen verschlossen ist (um die Kristalle zurückzuhalten) und dessen angeschmolzenes Rohr zweimal rechtwinklig gebogen ist, so daß es in eine mit der Filterpumpe verbundene Saugflasche eingepaßt werden kann. Der Niederschlag wird mit 10 cm^3 Benzol, das eine Temperatur von 10° C hat gewaschen, noch einmal in der halben Menge Benzol unter Erwärmen gelöst, wieder abgekühlt und wie oben beschrieben filtriert. In derselben Weise führt man eine dritte Umfällung aus, so daß im ganzen bei Verwendung von 1 *g* Fett und drei Fällungen 120—130 cm^3 Benzolfiltrat erhalten werden.

2. Trennung der festen gesättigten Fettsäuren.

Die festen Fettsäuren gewinnt man durch Zerlegung der in Äther unlöslichen Bleiseifen (siehe oben). Man kann die Bleiseifen in Wasser suspendieren und mit Salz- oder Schwefelsäure erhitzen. Man kann sie aber auch in der Weise zerlegen, daß man sie in etwa 50%igem Alkohol mit Kaliumkarbonat erhitzt. Man filtriert das Bleikarbonat ab, verdünnt das Filtrat noch etwas mehr mit Wasser, zerlegt die Seifen unter Anwendung von Methylorange mit Salz- oder Schwefelsäure, kühlt schnell ab und läßt zur möglichst völligen Abscheidung der Fettsäuren eine Zeitlang im Kühlen stehen. Die ausfallenden Fettsäuren saugt man ab und kristallisiert aus Alkohol um.

Schmelzpunkt und Säurezahl des Gemisches gibt einen Hinweis auf die zu erwartende Zusammensetzung. Die weitere Trennung kann versucht werden durch fraktionierte Fällung oder fraktionierte Destillation im Vakuum.

a) Fraktionierte Fällung.[1])

Der fraktionierten Fällung können die in Alkohol gelösten Säuren selbst oder deren Ammoniak- oder Natriumsalze unterworfen werden. Man fällt mit einer alkoholischen Lösung von Blei- oder besser Magnesiumacetat, oder mit einer wässerigen Lösung von Baryumacetat.

[1]) *Heintz,* Über die Zusammensetzung des Hammeltalgs, des Menschenfetts und des Wallrats. Ann. d. Chem. u. Pharm., N. T. 8. S. 297 (1852). *Fr. Nafzer,* Annalen d. Chem. u. Pharm. Bd. 224. S. 225 (1884).

Beispiel für eine fraktionierte Fällung.[1]) Um zunächst zu entscheiden, ob eine einheitliche Säure oder ein Gemisch vorliegt, löst man 1 *g* der zu prüfenden Säuren nach Bestimmung des Schmelzpunktes und Molekulargewichts in so viel heißem Alkohol, daß beim Erkalten auf Zimmertemperatur keine Ausscheidung eintritt und versetzt dann noch heiß mit einer zur vollständigen Fällung der Säure unzureichenden Menge Magnesiumacetat in Alkohol oder Baryumacetat in möglichst wenig Wasser. Schmilzt die Säure über 53°, so ist das Magnesiumsalz, andernfalls das Baryumsalz zu wählen. Von diesem nimmt man etwa zwei Fünftel des Gewichts der angewandten Säuren, von jenem dagegen nur etwa ein Viertel bis ein Fünftel. Beim Erkalten der Mischung scheidet sich nach einigem Stehen das Baryum- oder Magnesiumsalz aus. Man saugt den Niederschlag ab und zersetzt ihn durch Erwärmen mit Benzin und verdünnter Salzsäure unter häufigem Umschütteln. Die beiden Flüssigkeiten trennt man im Scheidetrichter und schüttelt die Benzinschicht nochmals mit heißer Salzsäure aus. Dann wäscht man mineralsäurefrei, dampft das Benzin ab und bestimmt Schmelzpunkt und Molekulargewicht der so gewonnenen Säure. Das Filtrat des Magnesiumniederschlags wird mit einem Stückchen Ätznatron eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure zersetzt. Die abgeschiedene Säure wird wie oben auf Schmelzpunkt und Molekulargewicht geprüft. Stimmen die mit den beiden Säureportionen und der ursprünglichen Säure erhaltenen Werte untereinander, so liegt eine reine Säure vor. Andernfalls hat man eine Mischung vor sich.

Um in einer solchen die einzelnen Säuren zu kennzeichnen, löst man 1—2 *g* Säure wie oben in Alkohol auf und fällt heiß mit einer alkoholischen Lösung von $^1/_{30}$—$^1/_{40}$ des Gewichts der angewandten Säure an essigsaurer Magnesia. Nach Abtrennen des Niederschlags wird im Filtrate die gebildete freie Essigsäure durch etwas Ammoniak abgestumpft, dann wird sukzessiv mit der gleichen Menge Magnesiumacetat weiter gefällt. Beim Kristallisieren darf die Temperatur nicht zu niedrig sein, da sonst Fettsäure sich mit dem Magnesiumsalz ausscheidet. Fällt das Magnesiumsalz nicht oder in ungenügender Menge aus, so wird die Lösung der Säuren etwas konzentriert. Ist keine Fällung mehr zu erzielen, so scheidet man aus der Lösung, wie oben beschrieben, die darin noch enthaltene Säure ab.

Aus den einzelnen Magnesiafällungen, deren man 7—8 erhalten wird, werden die Säuren abgeschieden und auf Schmelzpunkt geprüft. Gleichartig schmelzende Fraktionen werden vereinigt und zur Molekulargewichtsbestimmung benutzt. Aus Schmelzpunkt und Molekulargewicht wird man in vielen Fällen schon Schlüsse auf die Zusammensetzung des Säuregemisches ziehen können. Reine Säuren kann man oft erhalten, wenn man die Endglieder der Fällung mehrfach aus Alkohol umkristallisiert.

Nach *D. Holde* [2]) ermöglicht die fraktionierte Fällung der Fettsäuren nur bei Gegenwart zweier Säuren die klare Kennzeichnung beider Komponenten und führt in diesem Falle auch in verhältnismäßig kurzer Zeit zum Ziel. Bei Gegenwart von mehr Säuren und besonders auch bei Benutzung von zu wenig Ausgangsmaterial kann sie aber sehr leicht zu irrigen Schlüssen hinsichtlich der höher schmelzenden Komponenten führen.

b) Trennung der Fettsäuren durch Destillation im Vakuum.[3])

Die Destillation wird ausgeführt unter Anwendung einer Wasserstrahlpumpe bei 15—20 *mm* Hg oder mit Hilfe einer automatisch wirkenden

[1]) *Ubbelohde*, Handb. d. Chemie u. Technol. d. Öle u. Fette. Leipzig 1908. Bd. 1. S. 240.

[2]) Über die natürlich vorkommende Heptadecylsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 38. S. 1248 (1905).

[3]) *F. Krafft-W. A. Dyes*, Über Destillationen mit der kontinuierlich wirkenden Quecksilberluftpumpe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 28, S. 2583 (1895); *J. Precht*, Über

Quecksilberpumpe im absoluten Vakuum. Das Destillat wird bei nicht zu hoch schmelzenden Substanzen im *Brühl*schen Apparat aufgefangen. Bei hochschmelzenden Substanzen benutzt man Siedekolben, wie Bd. I, S. 124 beschrieben. Zweckmäßig ist es vielleicht unter Umständen, die Flüssigkeit nicht von außen zu erhitzen, sondern durch eine in der Flüssigkeit befindliche Platinspirale, die durch den elektrischen Strom erhitzt wird.

Siedepunkte der Fettsäure:

	bei 15 *mm* Hg	im absoluten Vakuum
Laurinsäure	176	102
Myristinsäure . . .	196·5	121—122
Palmitinsäure . . .	215	138—139
Stearinsäure . . .	232·5	154—155·5
Ölsäure	232·5	153
Elaidinsäure . . .	234	154
Erucasäure	264	179
Brassidinsäure . . .	265	180

Wie die Säuren, so kann man auch die Ester der fraktionierten Destillation unterwerfen, auch die Glykolester und die Triglyzeride bis zum Tripalmitin (310—320 Siedepunkt). Doch unterliegt dieses bereits der Zersetzung.[1])

Siedepunkte der Äthylester:

	bei 0 *mm* und 25 *mm* Steighöhe
Äthylstearat	139
Äthylpalmitat	122
Äthylmyristat	102
Äthyllaurinat	79

Nicht in allen Fällen ist eine Trennung durch fraktionierte Destillation durchführbar. Ein Gemisch von gleichen Teilen Palmitin- und Stearinsäure z. B. siedet bei nahezu 0 *mm* Druck größtenteils bei 151—152°.[2])

c) Abscheidung und Bestimmung der Stearinsäure.

Behandelt man das Fettsäuregemisch, das man bei der Zerlegung der in Äther unlöslichen Bleiseifen oder auch unmittelbar nach dem Ver-

eine Abänderung der *v. Babo*schen Wasserquecksilberluftpumpe zur Erzeugung hoher Luftverdünnungen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **29**. S. 1143 (1896); *F. Krafft-H. Weilandt*, Siedetemperaturen beim Vakuum des Kathodenlichts. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **29**. S. 1316 (1896); Über fraktionierte Destillation der höheren Normalparaffine aus Braunkohle im Vakuum des Kathodenlichts. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 4779 (1907).

[1]) *F. Krafft*, Über Reindarstellung hochmolekularer Säureester durch Vakuumdestillation. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 4339 (1903).

[2]) *Kreis* und *Hafner*, Über natürlich vorkommende und synthetisch dargestellte gemischte Fettsäureglyzeride. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 2769 (1903).

seifen der Fette erhalten hat, mit einer gesättigten alkoholischen Lösung von Stearinsäure, so bleibt die Stearinsäure ungelöst, während Palmitinsäure und Ölsäure in Lösung gehen.

Verfahren von *Hehner* und *Mitchell*[1]: Man stellt zunächst eine gesättigte Stearinsäurelösung her, indem man 3 *g* reiner Stearinsäure in 1 *l* warmem Alkohol vom spez. Gew. 0·8183, der 94·4 Volumprozent Alkohol enthält, in einer Stöpselflasche auflöst. Die Flasche wird in Eiswasser eingesenkt und über Nacht in einen Eisschrank gestellt.

Nach 12stündigem Stehen filtriert man die Mutterlauge, ohne den Kolben aus dem Eiswasser zu entfernen, mittelst eines zu einem kleinen Trichter erweiterten Rohres ab, welcher in die alkoholische Lösung eintaucht und mit feinem Linnen überzogen ist, um die ausgeschiedenen Stearinsäurekristalle zurückzuhalten. Das Trichterrohr ist zweimal rechtwinklig gebogen und in eine Saugflasche eingepaßt, so daß die klare Flüssigkeit mit Hilfe einer Saugpumpe abgezogen werden kann.

0·5—1 *g* des Fettsäuregemisches, falls es fest ist, oder 5 *g*, falls es flüssig ist, werden in einem Kolben genau abgewogen und in 100 cm^3 der wie oben dargestellten Stearinsäurelösung aufgelöst; der Kolben wird in Eiswasser über Nacht stehen gelassen, die Flüssigkeit am folgenden Morgen umgeschüttelt, während der Kolben sich im Eiswasser befindet, und dann etwa eine halbe Stunde lang im Eiswasser stehen gelassen, damit sich die Kristalle gut absetzen. Die alkoholische Lösung wird, wie oben beschrieben, abfiltriert, indem man dafür Sorge trägt, die Lösung so vollständig als möglich abzuziehen. Der im Kolben verbleibende Niederschag wird dreimal hintereinander mit je 10 cm^3 der alkoholischen auf 0° abgekühlten Stearinsäurelösung gewaschen. Schließlich werden die an den Wänden des Trichterchens hängenden Kristalle mit heißem Alkohol in den Kolben gespült, der Alkohol wird verdunstet und der Rückstand bei 100° getrocknet und gewogen.

Da die Kolbenwandung sowie auch die ungelösten Kristalle eine gewisse Menge der alkoholischen Stearinsäurelösung zurückhalten, ist eine Korrektur anzubringen, die nach *Hehner* und *Mitchell* 0·005 *g* beträgt, d. h. diese Menge muß von der für die Stearinsäure gefundenen Zahl abgezogen werden. Der Schmelzpunkt der Substanz soll nur wenig unter 68·5° liegen.

Nach dieser Methode wurden folgende Werte gefunden[2]:

Stearinsäuregehalt der Fettsäuren aus:

Olivenöl, Mandelöl, Maisöl	0%	Hammeltalg	16·4—22%
Palmöl	0·53—0·72%	Rindertalg	50·8%
Kokosnußöl	0·99%	Butter	0·5%
Kakaobutter	38·9—40·3%		

Enthält ein Fettsäuregemisch (siehe unten) neben der Stearinsäure nur Palmitinsäure, so ergibt sich die Menge der letzteren selbstverständlich aus der Gewichtsdifferenz zwischen der Menge der verwendeten Fettsäuren und der Menge der gefundenen Stearinsäure.

Stearinsäure $C_{18}H_{36}O_2$ bildet aus Alkohol kristallisiert geruch- und geschmacklose glänzende Blättchen. Sie ist in Wasser unlöslich, leicht löslich in heißem Alkohol. 100 Teile kalten Alkohols lösen 2·5 Teile Stearinsäure. In Äther ist sie leicht löslich. Schmelzpunkt 69·3. Spezifisches Gewicht beim Schmelzpunkt 0·8454.

[1] Über die Bestimmung der Stearinsäure in Fetten. Chem. Zentralbl. Jg. **1897**. I. S. 339. — *J. Lewkowitsch*, Chem. Technologie und Analyse der Fette etc. Braunschweig 1905. Bd. **1**. S. 387; siehe auch *Kreis* und *Hafner*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 2768 (1903).

[2] Vgl. *Lewkowitsch*, Handb. S. 388. — *Ubbelohde*, Handb. I. S. 238.

d) Gewinnung der Palmitinsäure.

Um die neben der Stearinsäure vorhandene Palmitinsäure zu gewinnen, verfährt man nach *Kreis* und *Hafner*[1]) folgendermaßen: Man bestimmt zunächst in dem ölsäurefreien Gemisch (siehe unten) nach *Hehner* und *Mitchell* die Menge der Stearinsäure. Dann berechnet man die Menge von Alkohol, welche erforderlich ist, um die anscheinend vorhandene Palmitinsäure bei 0° in Lösung zu halten, indem man die Erfahrung zugrunde legt, daß sich in 100 *cm*³ Alkohol von 15 Volumprozent bei 0° C 0·56 *g* lösen.

In dieser Menge löst man das Fettsäuregemisch und läßt 12—14 Stunden bei 0° C stehen. Man filtriert. Der Filterrückstand, zweimal aus Alkohol umkristallisiert, besteht aus reiner Stearinsäure. Das Filtrat, welches nur noch 0·12 *g* Stearinsäure in 100 *cm*³ enthält, wird auf die Hälfte konzentriert und mit so viel alkoholischer Magnesiumacetatlösung versetzt, als der in der Lösung gebliebenen Menge Stearinsäure äquivalent ist.

Nach 12—14stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird von dem ausgeschiedenen Niederschlag abfiltriert. Aus dem Filtrat wird die Fettsäure abgeschieden. Die Säure wird nun wieder in so viel Alkohol gelöst, daß sie bei Zimmertemperatur nicht auskristallisiert und ein Drittel der vorher zugesetzten Menge Magnesiumacetat hinzugegeben. Nach nochmaliger Wiederholung dieser Operation und nach dem Umkristallisieren aus Alkohol erhält man reine Palmitinsäure.

Palmitinsäure, $C_{16}H_{32}O_2$, ist geruch- und geschmacklos, in kaltem Alkohol nur wenig löslich. 100 Teile absoluten Alkohols von 19·5° lösen 9·32 *g* auf. Schmelzpunkt 62·6°. Spez. Gew. bei 80° bezw. auf Wasser von 4° C 0·8412°.

e) Gewinnung der Myristin- und Laurinsäure.

Zur Untersuchung der Fette auf Myristin- und Laurinsäure kann man durch eine verhältnismäßig hohe Säurezahl des Säuregemisches veranlaßt werden. Man wird dann wohl zunächst nach *c* die Stearinsäure entfernen und könnte daran denken, Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure mit Hilfe der verschiedenen Löslichkeit ihrer Lithiumsalze nach *Partheil* und *Ferié*[2]) zu trennen zu suchen.

Löslichkeit der Lithiumsalze.

	100 *cm*³ Wasser lösen bei		100 *cm*³ Alkohol, spezifisches Gewicht 0·797, lösen bei	
	18°	25°	18°	25°
Lithiumlaurat	0·158 *g*	0·176 *g*	0·418 *g*	0·4424 *g*
Lithiummyristat	0·0235 *g*	0·0234 *g*	0·184 *g*	0·22 *g*
Lithiumpalmitat	0·011 *g*	0·018 *g*	0·0796 *g*	0·0955 *g*
Lithiumstearat	0·01 *g*	0·012 *g*	0·041 *g*	0·0532 *g*
Lithiumoleat	0·0674 *g*	0·132 *g*	0·9084 *g*	1·009 *g*

[1]) Über natürlich vorkommende und synthetisch dargestellte gemischte Fettsäureglyzeride. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 2769 (1903).

[2]) Zur Kenntnis der Fette. Chem. Zentralbl. Jg. **1904**. I. S. 220.

K. Farnsteiner und *W. Fahrion* [1]) erhielten jedoch mit der von *Partheil* und *Ferié* angegebenen Methode keine brauchbaren Resultate.

Zur Darstellung für präparative Zwecke geht man von Pflanzenfetten aus, die reich an diesen Säuren sind, bei der Laurinsäure vom Lorbeeröl, bei der Myristinsäure von der Muskatbutter (siehe S. 222).

3. Charakterisierung der festen Fettsäuren, $C_n H_{2n} O_2$.

Zur Charakterisierung der gesättigten, festen Fettsäuren genügt im allgemeinen außer der Elementaranalyse und der Bestimmung der Azidität (Molekulargewicht) die Bestimmung des Schmelzpunktes und der anderen physikalischen Konstanten.

In manchen Fällen ist es aber notwendig, die Säuren in die entsprechenden Kohlenwasserstoffe überzuführen und auch diese zur Charakterisierung mit heranzuziehen. Man destilliert zu diesem Zwecke die Barytsalze der Säuren mit Barythydrat bei 15 *mm* Druck. [2])

4. Oxyfettsäuren und deren Laktone.

Die Anwesenheit von Oxyfettsäuren in Fetten, Wachsen etc. gibt sich zu erkennen, wenn man die Acetylzahl der Fettsäuren unter Berücksichtigung bzw. nach Entfernung etwa gleichzeitig vorhandener hochmolekularer Alkohole bestimmt.

Auf Laktone prüft man, indem man zunächst die Azidität der in Alkohol gelösten Fettsäuren bestimmt, dann eine bestimmte Menge alkoholischer Kalilauge zusetzt, eine Zeitlang kocht und sieht, ob Alkali gebunden wird. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß Laktone aus Oxysäuren entstehen können, wenn man die Fettsäuren, nach dem Verseifen des Fettes aus den Seifen mit Mineralsäuren in Freiheit setzt; ferner daß sich Ester bilden können, wenn die Zerlegung der Seifen durch Mineralsäuren bei Gegenwart von Alkohol geschieht und auch schon, wenn Fettsäuren mit Alkoholen erhitzt werden. Säureanhydride bilden sich nach *Lewkowitsch* aus den Fettsäuren beim Kochen mit Essigsäureanhydrid.

Dargestellt sind Oxysäuren aus dem Wollfett [3]), dem Wachs der Cochenille [4]) sowie dem Karnaubawachs. [5]) In bezug auf Isolierung und Charakterisierung sei auf die Originalarbeiten hingewiesen.

---

[1]) Über die Lithiummethode zur Trennung der gesättigten Säuren der Fette. Jg. **1904**. II. S. 738. 1521.

[2]) *F. Krafft-R. Schaal,* Über hochschmelzende Säuren des Japanwachses. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 4787 (1907). — Siehe auch *J. Mai,* Über Kohlensäureabspaltung mit Hülfe von Natriumalkoholat. Ebenda. Jg. **22**. S. 2133 (1889).

[3]) *L. Darmstädter* und *J. Lifschütz,* Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung des Wollfettes. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **28**. S. 3133 (1895). Jg. **29**. S. 618, 1474 (1896). Jg. **31**. S. 97 (1898).

[4]) *C. Liebermann,* Über das Wachs und die Fette der Cochenille. Ebenda. Jg. **18** S. 1975 (1885); Jg. **20**. S. 959 (1887).

[5]) *Stürcke,* Über die chemischen Bestandteile des Carnaubawachses. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **223**. S. 283 (1884).

Am besten bekannt ist von natürlich vorkommenden Oxyfettsäuren die Rizinolsäure.

Die Rizinolsäure, $C_6 H_{13} . CH (OH) . CH_2 . CH : CH (CH_2)_7 COOH$[1], wird aus dem festen Anteil der beim Verseifen von Rizinusöl entstehenden Fettsäuren erhalten. Man kühlt die Fettsäuren auf 0° ab. Die sich ausscheidenden festen Massen werden abgepreßt und in das Bariumsalz übergeführt, das man durch Umkristallisieren aus Alkohol von der anwesenden Stearinsäure und Dioxystearinsäure befreit.

Die Rizinolsäure schmilzt bei 4—5°, ist in Alkohol und Äther leicht löslich. $[\alpha]_D + 6\cdot25$. Bei der Destillation zerfällt sie unter Bildung von Undezylensäure. Die Eigenschaften anderer Oxyfettsäuren siehe S. 234.

5. Dikarbonsäuren.

Hochmolekulare Dikarbonsäuren finden sich in kleinen Mengen im Japanwachs.[2] Die aus dem verseiften Japanwachs in Freiheit gesetzten Säuren werden unter 15 *mm* bei 250° C abdestilliert. Der Rückstand wird durch Umkristallisieren aus 75%igem Alkohol von harzigen Beimengungen getrennt und der Rektifikation im Vakuum bei 0 *mm* unterworfen.

Auch die Dikarbonsäuren lassen sich durch Destillation mit Barythydrat bei vermindertem Druck in die entsprechenden gesättigten Kohlenwasserstoffe überführen. Aus einer Dikarbonsäure des Japanwachses, deren Zusammensetzung und Derivate (Ester und Diamid) der Formel $CO_2 H . (CH_2)_{19} . CO_2 H$ entsprachen, wurde ein mit dem synthetischen übereinstimmendes Normalnonadekan, $C_{19} H_{40}$, erhalten.

6. Ungesättigte Fettsäuren.

Die ungesättigten Fettsäuren gewinnt man aus den in Äther löslichen Bleiseifen (siehe oben). Man sucht eine Vorstellung von der Zusammensetzung des erhaltenen Öles zu gewinnen durch Bestimmung der Jodzahl und Azidität, bestimmt die Acetylzahl, prüft auf Laktone, untersucht auf optische Aktivität u. a.

Ölsäure, $C_{18} H_{34} O_2$. Zur Darstellung wird das Öl, welches man aus den ätherlöslichen Bleiseifen des Olivenöls oder Schweinefetts gewonnen hat, in Ammoniak gelöst und die Lösung mit Chlorbarium versetzt. Das abgeschiedene Bariumsalz wird wiederholt aus Alkohol umkristallisiert und mit Weinsäure zerlegt. Die Ölsäure wird durch Destillation im Vakuum gereinigt.[3]

Die Ölsäure ist in Wasser unlöslich, aber schon in kaltem verdünnten Alkohol löslich. Sie erstarrt bei 4° kristallinisch, schmilzt bei 14° C, siedet unter 100 *mm* Druck bei 286° C, unter 10 *mm* bei 223° im absoluten Vakuum bei 153°.

Außer der Elementaranalyse, Azidität (Molekulargewicht) und den physikalischen Konstanten dienen zur Charakteristik der ungesättigten Fettsäuren besonders die Jodzahlen, die Bromverbindungen, die durch Reduktion zu erhaltenden gesättigten Fettsäuren und die bei der Oxydation entstehenden

[1] *F. Krafft*, Zur Kenntnis der Rizinoleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **21**. S. 2730 (1888).

[2] *F. Krafft* und *R. Schaal*, Über hochschmelzende Säuren des Japanwachses. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 4784 (1907).

[3] *Gottlieb*, Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **57**. S. 38.

Produkte, von letzteren vor allem die Oxysäuren, welche sich bei der Einwirkung von Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung bilden. Auch die ungesättigten Kohlenwasserstoffe, die, wie bei den gesättigten Säuren, durch Destillation mit Barythydrat gewonnen werden, können zur Charakterisierung benutzt werden.[1])

Die Bromverbindung und die Oxysäuren sind im besonderen geeignet, um auf Linol-, Linolen- und Isolinolensäure zu untersuchen, die sich neben Ölsäure in trocknenden und halbtrocknenden Ölen und Tranen finden.

a) Prüfung auf Linol- und Linolensäure etc. mit Hilfe der Bromide.

Die Bromierung kann sowohl in einer Lösung von Essigsäure wie von Chloroform vorgenommen werden. Sie scheint ziemlich glatt zu verlaufen. Zweckmäßig verfährt man so, daß man das Fettsäuregemisch in Chloroform löst und unter Abkühlen mit einem kleinen Überschuß des in Chloroform gelösten Broms versetzt. Dann dampft man bei Zimmertemperatur im Vakuum völlig ein. Den Rückstand löst man unter gelindem Erwärmen in Petroläther und stellt ins Kühle.[2]) Ist nur Ölsäure vorhanden, so erfolgt keine Abscheidung, da das Ölsäuredibromid in Petroläther (auch in Eisessig und Äther) leicht löslich ist.[3]) Bei Anwesenheit von Linol-, Linolensäure u. a. scheidet sich ein Niederschlag ab, der die Tetra-, Hexa- und Oktobromide enthält.

Die Menge dieses Niederschlages, als Linolsäure berechnet, betrug nach *Farnsteiner* für Kottonöl 18·2—23·9% der flüssigen Fettsäuren, bei Sesamöl 15·2—16·4% der Fettsäuren; aus den Fettsäuren des Erdnußöls waren bei direkter Bromierung keine Bromide zu erhalten, dagegen aus 1 *g* der Säuren, deren Barytsalz in Benzol-Alkohol löslich war, 20·5% usw.

Zur Orientierung über die Zusammensetzung der Bromverbindung dient neben der Brombestimmung die Bestimmung des Molekulargewichtes durch Titrierung der Azidität.

Molekulargewicht:

Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure .	278—282 *g*
Ölsäure-Dibromid	442 *g*
Linolsäure-Tetrabromid	600 *g*
Linolensäure-Hexabromid	758 *g*

Eine Trennung der Bromide ist möglich durch ihr verschiedenes Verhalten zu Äther. Das Tetrabromid ist in Äther leicht löslich, das Hexabromid sehr schwer, es löst sich aber in kochendem Benzol, das Oktobromid ist auch in diesem unlöslich. Hierauf beruht die „Hexabromidprobe".

[1]) *F. Krafft-R. Schaal*, Über hochschmelzende Säuren des Japanwachses. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 4787 (1907).

[2]) Vgl. *K. Farnsteiner*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1899. S. 1.

[3]) *O. Hehner* und *C. A. Mitchell*, Beitrag zur Chemie der trocknenden Öle etc. Chem. Zentralbl. 1899. I. S. 381.

Die Hexabromidprobe wird, entsprechend den Beobachtungen von *K. Hazura*[1]), nach *O. Hehner* und *C. A. Mitchell* in zweierlei Weise ausgeführt.

a) Man löst 0·2—0·3 *g* Fettsäuren in 10 *cm*³ Essigsäure und kühlt in verkorkter Flasche auf 5° ab. Alsdann fügt man tropfenweise Brom zu, bis die Bromfarbe bestehen bleibt. Nach 3 Stunden filtriert man durch einen Asbesttiegel, wäscht mit gekühlter Essigsäure, Alkohol und Äther in Portionen von je 5 *cm*³ sukzessive aus und trocknet den weißen Rückstand im Wassertrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz.

b) Man löst 1—2 *g* Öl in 40 *cm*³ Äther, fügt wenige Kubikzentimeter Essigsäure hinzu, kühlt die Lösung in Eis ab, setzt Brom in kleinem Überschuß hinzu und beläßt das Gemisch über Nacht in Eis. Man filtriert dann unter Saugen durch ein mit Putzleder überzogenes, mit Asbest beschicktes Filterrohr, wäscht viermal mit je 10 *cm*³ Äther von 0° C und trocknet.

Hexabromidausbeuten nach *Hehner* und *Mitchell* u. a.[2])
in Prozenten der Glyzeride.

Leinöl	23—37	Dorschleberöl .	30·6—52·3
Tungöl . . .	0—0·39	Haifischleberöl .	19—22
Candelnußöl . .	7·28—8·21	Robbentran . .	27·5—27·9
Walnußöl . . .	1·4—1·9	Walfischtran .	15·5—25
		Walratöl . . .	2·4—2·6

Mohnöl, Mais-, Baumwollensamen-, Paranuß-, Mandel-, Olivenöl geben keine Hexabromide.

Die aus der Linolsäure entstehende Tetrabromstearinsäure ist schwer löslich in Petroläther (0·014—0·021 *g* in 100 *cm*³ von 12·5° C), leicht löslich in Äther, Eisessig, Chloroform, Alkohol. Aus kalt gesättigter Lösung von Eisessig oder Alkohol kristallisiert sie beim freiwilligen Verdunsten des Lösungsmittels in weißen, perlmutterglänzenden Blättchen, die unter dem Mikroskop sich als aus zarten, zu Büscheln gruppierten Nadeln bestehend erweisen. Schmelzpunkt 114—115°. Das Kalisalz ist in Alkohol löslich.

Durch Natriumamalgam in alkalischer Lösung, Zink in essigsaurer, Zinn und Salzsäure in alkoholischer Lösung wird das Tetrabromid zur Linolsäure reduziert. Man löst z. B. 17 *g* des Bromids in 600 Alkohol und kocht mit 150 *cm*³ rauchender Salzsäure und Zinnfolie 36 Stunden am Rückflußkühler. Dann verdünnt man mit Wasser und schüttelt mit Äther. In diesen geht der Ester der Linolsäure. Man schüttelt zur Entfernung von Säuren mit verdünntem Ammoniak und destilliert den Äther ab.[3])

Die aus der Linolensäure entstehende Hexabromstearinsäure ist sehr schwer löslich in Petroläther, Äther Alkohol, Eisessig, Chloroform und Benzol. Schmelzpunkt 177°. Zur Bestimmung des Molekulargewichts löst man das Bromid bei etwa 75° C in der etwa 50fachen Menge Benzol, setzt die gleiche Menge heißen absoluten Alkohols hinzu und titriert heiß. Das Kalisalz scheidet sich beim Erkalten so gut wie vollständig aus *(K. Farnsteiner)*.

[1]) *K. Hazura*, Untersuchungen über die Hanfölsäure. Monatsschr. f. Chem. Bd. 8. S. 147 (1887).

[2]) *Overbeck*, Über die Abkömmlinge der Ölsäure. Annal d. Chemie u. Pharm. Bd. **140**. S. 42.

[3]) *K. Hazura*, Über die Hanfölsäure. Monatsh. f. Chem. Bd. 8. S. 147 (1887).

b) Oxydation der ungesättigten Fettsäuren mit Kaliumpermanganat nach *Hazura*.

Die ungesättigten Fettsäuren addieren nach *K. Hazura*[1]) in ihren alkalischen Lösungen bei der Oxydation mit Lösungen von Kaliumpermanganat soviel Hydroxylgruppen, als sie freie Valenzen enthalten und bilden gesättigte Oxyfettsäuren, welche dieselbe Anzahl Atome von Kohlenstoff im Molekül enthalten.

Verfahren von *K. Hazura*.[2]) 30 *g* der flüssigen Fettsäuren werden mit 36 *cm*³ Kalilauge von der Dichte 1·27 (368 *g* KOH im Liter) verseift. Die Seifen werden in 2 *l* Wasser gelöst. In diese Lösung läßt man unter fortwährendem Rühren 2 *l* einer 1½%igen Kaliumpermanganatlösung bei Zimmertemperatur einfließen. (Bei Säuren aus Tranen kühlt man auf 0° C ab und verwendet halbprozentige Permanganatlösung.) Man filtriert das Mangansuperoxyd ab und säuert das alkalische Filtrat mit Schwefelsäure an. Hierbei fällt ein Säuregemisch aus, das neben unveränderter Ölsäure Dioxystearinsäure, Sativinsäure und Linusinsäure enthält. Das Filtrat wird mit Kalilauge neutralisiert. Je 4 *l* von ihm werden auf etwa 300 *cm*³ eingeengt. Die einzelnen Portionen werden vereinigt, abermals mit Schwefelsäure angesäuert und auch das nunmehr herausfallende, aus Linusinsäure und Isolinusinsäure bestehende Säuregemisch II durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt. In Lösung bleibt Azelainsäure u. a.

Das Säuregemisch I wird auf Tontellern getrocknet und zur Entfernung nicht oxydierter Säuren mit Äther oder Petroläther gewaschen. Dann wird mit der 100fachen Menge kaltem Äther behandelt.

Hierbei geht die Dioxystearinsäure in Lösung. Um sie zu gewinnen, wird der Äther eingeengt. Sie fällt beim längeren Stehen aus und wird durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt.

Der in Äther unlösliche Teil (Sativinsäure und Linusinsäure, auch etwa ungelöst gebliebene Dioxysäure) wird aus heißem Wasser fraktioniert. Will man von vorneherein nur Sativinsäure gewinnen, so führt man das bei der Oxydation erhaltene Säuregemenge in das Kalisalz über und fällt mit Chlorbarium. Die Barytsalze werden durch Auskochen mit Wasser von Azelainsäure und Linusinsäure befreit. Der in Wasser unlösliche Teil wird mit Salzsäure zerlegt und die Säure aus Wasser umkristallisiert.

Das Säuregemisch II wird ebenfalls auf Tonplatten getrocknet und zur Entfernung von Azelainsäure u. a. mit Äther extrahiert. Der in Äther unlösliche Teil wird aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Die Kristallisationen werden dann weiter durch Kristallisation aus wenig Wasser in Linusinsäure und Isolinusinsäure zerlegt.

---

[1]) *A. Bauer* und *K. Hazura*, Über die Hanfölsäure. Monatsh. f. Chem. Bd. 7. S. 216 (1896); *K. Hazura*, Über Hanfölsäure. Ebenda. Bd. 8. S. 147 ff. (1887); Bd. 9. S. 198 (1888).

[2]) Monatsh. f. Chem. Bd. 9. S. 198 (1888).

Die Dioxystearinsäure[1]), $C_{18}H_{34}O_2(OH)_2$, welche bei der Oxydation von Ölsäure entsteht, kristallisiert in rhombischen, oft an zwei gegenüber liegenden Ecken abgestumpften Tafeln, die in Wasser unlöslich sind, leicht löslich in heißem, sehr schwer in kaltem Alkohol und heißem Äther. Schmelzpunkt 136·5°. Baryumsalz unlöslich in kaltem und heißem Wasser.

Sativinsäure, $C_{18}H_{32}O_2(OH)_4$, ist unlöslich in kaltem Wasser, Äther, Schwefelkohlenstoff, Benzol, Chloroform, löslich in 2000 Teilen siedendem Wasser, in Eisessig, schwer löslich in Alkohol. Zu ihrer Kristallisation löst man sie in der eben nötigen Menge heißem Eisessig, fügt soviel heißes Wasser hinzu, bis eine Trübung entsteht, dann wieder soviel Eisessig, bis die Trübung verschwindet. Nach einigen Tagen scheiden sich schöne, perlmutterglänzende Kristalle ab, die unter dem Mikroskop die für Sativinsäure charakteristischen Formen zeigen, lange Nadeln und Prismen mit aufgesetzten Pyramiden *(K. Hazura)*. Schmelzpunkt 173°. Baryumsalz in kaltem und heißem Wasser unlöslich.

Linusinsäure, $C_{18}H_{30}O_2(OH)_6$, ist in heißem Wasser leichter löslich als Sativinsäure, dagegen schwerer löslich in Alkohol, unlöslich in Äther. Sie kristallisiert aus Wasser selten in Nadeln, gewöhnlich in rhombischen Tafeln, die oft an zwei gegenüberliegenden Ecken abgestumpft sind. Schmelzpunkt 203—205°. Baryumsalz in kaltem Wasser schwer, in heißem Wasser leicht löslich.

Isolinusinsäure, $C_{18}H_{30}O_2(OH)_6$, ist schwer löslich in kaltem, löslich in heißem Wasser, löslich in kaltem und leicht löslich in heißem Alkohol, unlöslich in Äther, Benzol, Toluol, Schwefelkohlenstoff, Chloroform. Kristallisiert wasserfrei in kleinen, prismatischen Nadeln. Schmelzpunkt 173—175°. Das Baryumsalz ist in heißem Wasser leicht löslich.

Azelainsäure, $C_7H_{14}(COOH)_2$, ist in heißem Wasser leicht, in Alkohol sehr leicht löslich. Schmelzpunkt 106·2°.

7. Untersuchung der flüchtigen Fettsäuren.

Die flüchtigen Fettsäuren werden aus den Fetten nach der Verseifung, aus anderen Objekten, z. B. Gärungs- und Fäulnisgemischen, ohne weiteres nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure durch Destillation mit Wasserdämpfen gewonnen.

In den Fetten ist ihre Menge so gering, daß vor der weiteren Verarbeitung die vereinigten Destillate neutralisiert und eingeengt werden müssen. Man übersättigt wieder mit Schwefelsäure und unterwirft die Flüssigkeit unter Nachfüllen des abdestillierenden Wassers von neuem, und zwar einer fraktionierten Destillation, indem man das Volumen jeder folgenden Destillation doppelt so groß als das der vorhergehenden nimmt. Hierbei geht zuerst Kaprinsäure, später Buttersäure, zuletzt Essigsäure über.[2]) Die zuerst übergehenden öligen Anteile werden in Ammoniak gelöst und mit Silbernitrat gefällt. Die wasserlöslichen Fraktionen werden mit Silberkarbonat erhitzt, heiß filtriert und, wenn nötig, auf dem Wasserbade zur Kristallisation eingedampft. Die nach dem Abkühlen erhaltenen Silber-

[1]) *Saytzeff*, Über die Oxydation der Ölsäure und Eladinsäure mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung. Journ. f. prakt. Chem. [2] Bd. 33. S. 300 (1886).

[2]) *A. Fitz*, Über Schizomyceten-Gärungen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 11. S. 46 (1878).

salze werden abfiltriert und im Luftbade bei 50—60° getrocknet, dann wird ihr Silbergehalt bestimmt.[1])

Hat man es, wie bei der Fäulnis, mit größeren Mengen von flüchtigen Fettsäuren zu tun, so schüttelt man die Destillate mit Äther aus, trocknet diesen mit geglühtem Glaubersalz, verdunstet den Äther und unterwirft den Ätherrückstand der fraktionierten Destillation.[2]) Die Fraktionen unterwirft man der Analyse. Man macht eine Verbrennung, bestimmt die Azidität, stellt das Silber- oder Calciumsalz dar, deren Silber- oder Kalk- bzw. Kristallwassergehalt man bestimmt und untersucht auf optische Aktivität.

Zur Identifizierung der flüchtigen Fettsäuren bis zur Oenanthsäure scheint auch ihre Überführung in Guanamine geeignet.[3]) Diese durch ihre Kristallisationsfähigkeit ausgezeichneten Körper entstehen, wenn man das Guanidinsalz der flüchtigen Fettsäure — es genügen 1—2 *g* des Salzes — auf 220—230° erhitzt.

Die Reaktion erfolgt nach der Gleichung

$$2\ C_n H_{2n} O_2 . CH_5 N_3 = C_{n+2} H_{2n+3} N_5 + 4\ NH_3 + 2\ C_n H_{2n} O_2.$$

In seinen Arbeiten über die Gärung hat *M. Nencki* wiederholt von dieser Reaktion Gebrauch gemacht und gelegentlich einer Untersuchung der flüchtigen Bestandteile der menschlichen Exkremente hat *L. Brieger*[4]) mittelst dieser Methode die Gegenwart der Isobuttersäure darin nachgewiesen.

Formoguanamin. Reines kohlensaures Guanidin wird in konzentrierter wässeriger Ameisensäure aufgelöst und auf dem Wasserbade getrocknet, bis die Flüssigkeit eine ziemlich dickliche Konsistenz angenommen hat. Hierauf wird sie in einem offenen Kolben auf dem Sandbade erwärmt. Bei 200° tritt lebhafte Gasentwicklung ein. Man erhält die Temperatur genau auf 200°, bis die Flüssigkeit sich trübt und die Ausscheidung von Kristallen eintritt, deren Menge bei fortgesetztem Erwärmen sich noch vermehrt. Nach wenigen Minuten läßt man erkalten und versetzt die Schmelze mit dem gleichen Volumen kalten Wassers. Es scheidet sich dann die Base als gelbweißer, körniger Niederschlag aus, während das unzersetzte ameisensaure Guanidin in Lösung geht. Die abgeschiedene Base wird nun am zweckmäßigsten in der nötigen Menge heißen Wassers aufgelöst und durch Zusatz einer gesättigten Oxalsäurelösung in das in kaltem Wasser unlösliche oxalsaure Salz verwandelt. Aus diesem Salze wird durch Kali oder Natronlauge die Base in weißen, rhombischen Nadeln abgeschieden. Aus Wasser umkristallisiert bildet sie vierseitige gestreifte Pyramiden, die zu sternförmigen Kristallgruppen in der Weise zusammentreten, daß die Spitzen der Pyramiden gegen ein gemeinsames Zentrum gerichtet sind (Fig. 17).

Acetoguanamin. Das aus reinem kohlensauren Guanidin dargestellte essigsaure Salz wird auf dem Sandbade getrocknet und dann auf 228—230° erhitzt und eine Viertelstunde auf dieser Temperatur gehalten. Dann läßt man erkalten und zieht die

[1]) *Hecht,* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **209**. S. 319 (1881).

[2]) *C. Neuberg* und *E. Rosenberg,* Über die bei der Eiweißfäulnis auftretenden Fettsäuren. Biochem. Zeitschr. Bd. 7. S. 178 (1907).

[3]) *Carl Haaf,* Zur Kenntnis der Guanamine; *M. Nencki,* Opera omnia. Bd. 2. Braunschweig 1904. S. 229.

[4]) Über die flüchtigen Bestandteile der menschlichen Exkremente. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **10**. S. 1027.

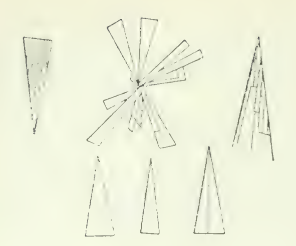


Fig. 17.

Formoguanamin.

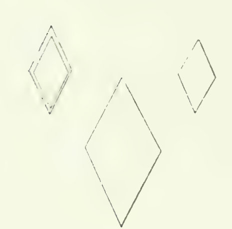


Fig. 18.

Acetoguanamin.

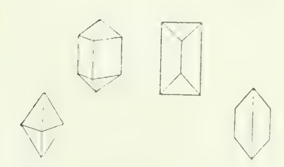


Fig. 19.

Propioguanamin.



Fig. 20.

Butyroguanamin, aus Natronlauge kristallisiert.

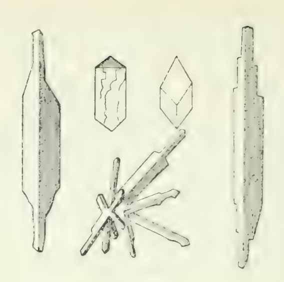


Fig. 21.

Isobutyroguanamin.

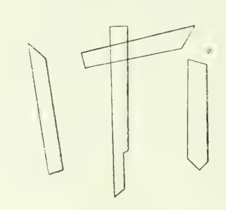


Fig. 22.

Valeroguanamin.





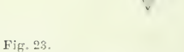


Fig. 23.

Kaproguanamin, aus Natronlauge kristallisiert.

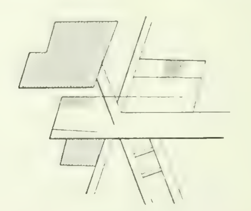


Fig. 24.

Oenanthoguanamin.

Schmelze mit wenig heißem Wasser aus. Man gießt von einem geringen, amorphen, unlöslichen Rückstand ab. Aus der heißen Lösung scheidet sich beim Erkalten eine Gallerte ab, die abgepreßt und mit verdünnter Kali- oder Natronlauge zerlegt wird. Aus Wasser umkristallisiert bildet das Acetoguanamin sehr schön ausgebildete, glänzende, dem Cholesterin ähnliche rhombische Tafeln (Fig. 18).

Propioguanamin durch einstündiges Erhitzen von Propionsäure und Guanidinkarbonat auf 220—230°. Die Schmelze wird mit heißem Wasser ausgezogen, es wird heiß filtriert und das Filtrat mit konzentrierter Natronlauge zerlegt. Beim Umkristallisieren aus Wasser erhält man äußerst wohl ausgebildete Pyramiden von quadratischem Habitus (Fig. 19).

Butyroguanamin kristallisiert beim langsamen Erkalten ohne Verdunsten der wässerigen Lösung auf dem Wasserbade in viereckigen Tafeln, deren Winkel rechte sind (Fig. 20).

Isobutyroguanamin kristallisiert in spitzen Rhomboedern (Fig. 21).

Isovaleroguanamin, aus Isopropylessigsäure, bildet glänzende, weiße Nadeln des rhombischen Systems, die namentlich beim raschen Abkühlen radial oder längs der Hauptachse zusammengewachsen erscheinen (Fig. 22).

Kaproguanamin bildet kleine glitzernde Kristalle, die unter dem Mikroskop als wohl ausgebildete, quadratische Pyramiden, zum Teil mit einer Basisfläche abgestumpft, erscheinen; oft bilden sie auch Zwillinge (Fig. 23).

Oenanthoguanamin ist in Wasser nur wenig löslich, es kristallisiert in rhombischen Tafeln und Stäbchen, welche oft zu federförmigen Aggregaten zusammentreten (Fig. 24).

Fettbestimmung in Organen.

Von **Georg Rosenfeld**, Breslau.

Die Schwierigkeit, durch die gewöhnlichen Lösungsmittel, wie Äthyläther, Petroläther, Chloroform, die Fettmenge in Organen zu bestimmen, beruht darauf, daß die Extraktionsmittel nicht an das in das Organmaterial eingeschlossene Fett herankommen und es auflösen können. Es kann nun zwei Wege geben, die Zugänglichkeit der Fette zu erhöhen. Entweder löst man die Organe selbst auf — so durch Verdauung mit Pepsin und Salzsäure (*Radziejewski*[1]), *Zawilski*[2]), *Dormeyer*[3]), *Pflüger*[4]) oder durch Salzsäure (*Nerking*[5]), auch durch Kalilauge (*v. Liebermann* und *Székely*[6]) — oder man macht die Organsubstanz osmotisch zugängiger, wozu in erster Reihe der Alkohol zu verwenden ist.

Die Substanz wird erst mit Alkohol kalt oder warm behandelt und dann mit Äther (*Bogdanow*[7, 8, 9]), *Voit*[10]), *Paton*) oder anderen Lösungsmitteln — Chloroform (*Rosenfeld*[11, 12]) — ausgezogen.

---

[1]) *E. Radziejewski*, Experimentelle Beiträge zur Fettresorption. *Virchows* Archiv. Bd. **43**. S. 1868.

[2]) *Zawilski*, Arbeiten aus dem Leipziger physiol. Institut.

[3]) *C. Dormeyer*, Die quantitative Bestimmung von Fetten, Seifen und Fettsäuren in tierischen Organen. *Pflügers* Archiv. Bd. **65**. S. 90 (1897).

[4]) *E. Pflüger*, Über die Entstehung von Fett aus Eiweiß im Körper der Tiere. *Pflügers* Archiv. Bd. **51**. S. 277 (1892).

[5]) *Josef Nerking*, Neue Beiträge zur Fettbestimmung in tierischen Geweben und Flüssigkeiten. *Pflügers* Archiv, Bd. **73**. S. 172 (1898).

[6]) *Leo v. Liebermann* und *S. Székely*, Eine neue Methode der Fettbestimmung in Futtermitteln, Fleisch etc. *Pflügers* Archiv. Bd. **72**. S. 360 (1898).

[7]) *E. Bogdanow*, Über die Fette des Fleisches. *Pflügers* Archiv. Bd. **65**. S. 81 (1897)

[8]) *E. Bogdanow*, Weitere Untersuchungen über die Fette des Fleisches. *Pflügers* Archiv. Bd. **68**. S. 408 (1897).

[9]) *E. Bogdanow*, Neue Methode der Fettbestimmung in tierischen Substanzen. Vorl. Mitteilung. *Pflügers* Archiv. Bd. **68**. S. 431 (1897).

[10]) *Erwin Voit*, Ein Beitrag zur Methode der Fettbestimmung. Zeitschr. f. Biol. Bd. **35**. S. 555 (1897).

[11]) *Georg Rosenfeld*, Zur Methodik der Fettbestimmung. Zentralbl. f. inn. Med. Bd. **21**. S. 833 (1900).

[12]) *Georg Rosenfeld*, Notizen zur Fettbestimmungsmethode. Zentralbl. f. inn. Med. Bd. **26**. Nr. 14 (1905).

Die Aufschließung durch Verdauung, durch Säure oder Alkali scheint die denkbar besten Resultate zu versprechen, und doch sind die hiermit erhaltenen Extraktmengen kleiner als mit anderen Methoden der zweiten Art. Außerdem wird das Fett durch die Verseifung mit KHO so verändert, daß die Form, in der es in den Organen wirklich vorhanden ist, ganz verloren ist. Die Extraktmengen, die mit der Alkohol-Chloroformmethode erhalten werden, übertreffen alle Ergebnisse anderer Verfahren, wenn man dem Quantum nach urteilt.

Eine zweite Schwierigkeit ist die, daß durch alle Verfahren noch andere Substanzen als reines Fett in das Lösungsmittel übergehen. Haben doch Lezithin, Cholesterin etc. dieselbe Lösungsfähigkeit in den Extraktionsmitteln wie die Fette und lösen sich außerdem in den extrahierten Fetten. Es ist also kein Wunder, wenn in allen Extrakten Lezithin oder, wenn es verseift worden ist, dessen Komponenten, die Fettsäuren, Cholin u. a. gefunden werden.

Die Vorbereitung der Substanzen für die Fettbestimmung ist nach deren Art verschieden.

Handelt es sich um einzelne Organe, wie Leber, Herz, Nieren, Muskeln, so bedürfen sie erstlich einer anatomischen Vorbereitung. Von der Leber werden die Gallenblase und die großen Venen herausgeschnitten; es genügt, bei der gleichmäßigen Verteilung des Fettes in der ganzen Leber aus verschiedenen Leberlappen einige Stücke, 70—100 *g*, abzunehmen und sie klein geschnitten bei 70—80° unter mehrmaligem Umwenden im Trockenschrank lufttrocken zu machen, wozu ca. 6—8 Stunden gehören. Dann wird die trockene Substanz auf einer größeren Pfeffermühle zermahlen und für die Extraktion eine Menge von 5—20 *g* in die Extraktionspatrone hinein abgewogen, während 1—2 *g* für die Bestimmung des Wassergehaltes der lufttrockenen Substanz bis zur Konstanz getrocknet werden (im Wägegläschen).

Ist die Leber äußerst fettreich, so schmilzt bei der Erhitzung Fett heraus, das die Trocknung wie die Pulverung stören würde; da empfiehlt es sich, die 2—3 Stunden getrocknete Leber — nach völligem Erkalten — mit Äthyläther zu übergießen, den Äther abzugießen und dann nach vorsichtigem Verjagen des Äthers fertig zu trocknen. Die Fettätherlösung wird filtriert, der Äther abdestilliert, der Rückstand getrocknet, gewogen und pro rata parte dem durch Extraktion erhaltenen Fette der trockenen Leber zugerechnet.

Beim Herzen muß das ganze Epikard mit darunter liegender Fettschicht (oft bis in die Gefäßscheiden hinein zu verfolgen!) ausgeschnitten, die Vorhöfe bis unter den Ansatzring sowie die Sehnenfäden und Klappen abgeschnitten werden. Die Präparation der Muskeln erfordert Abtragung der Faszien und des sichtbaren Fettes, was am besten erreicht wird, wenn man den Muskel seiner anatomischen Form nach freilegt und dann von der Fascie befreit. Das so präparierte Fleisch muß besonders fein geschnitten werden, damit es sich leichter mahlen läßt. An den Nieren muß das ganze

Nierenbecken mit seinen Ansätzen bis zur Grenzschicht ausgeschnitten werden, so daß in der Hauptsache nur Rindensubstanz übrig bleibt. Bei Pferdenieren ist die Ausscheidung des sichtbaren Fettes sehr schwierig.

Im wesentlichen ist das Verfahren dasselbe, wenn man ganze Tiere (Hunde, Gänse, Enten) extrahieren will. Wenn sie mager sind, lassen sie sich, nachdem sie zerkleinert sind, ganz gut trocknen. Der Zerkleinerung geht zweckmäßig das Rasieren, resp. Rupfen voran. Dann wird alles von Weichteilen mit Messer und Schere grob abgetragen und zerhackt. Die Knochen werden mit dem Hackbeil möglichst zerkleinert. Auf großen Pfannen und bei öfterem Umwenden gelingt die Trocknung in mehreren Tagen.

Es ist natürlich sehr angenehm, wenn man nicht das ganze Tier erst zu trocknen braucht: Wenn man nur einen Teil der Tiermasse trocknen und zur Extraktion vorbereiten will, so muß natürlich dieser Teil eine Probe des homogen gemachten Tierkörpers vorstellen. Dies gelingt auf folgende Weise: Das von Federn oder Haaren befreite Tier wird in einem Blechgefäß in eine um das Blechgefäß eingefüllte Kältemischung gebracht, während etwa 15—20 Stunden darin belassen und so ziemlich durchgefroren. Man kann jetzt die Extremitäten und andere große Teile mit dem Messer noch abtrennen, eventuell mit Zuhilfenahme der Säge, und kann in einer großen Fleischmühle die gefrorenen Tierteile mitsamt den Knochen zerkleinern.

Man erhält auf diese Weise schließlich einen Brei, den man nur bis zur Gleichmäßigkeit zu mischen braucht, um dann seine Zusammensetzung an einer großen Teilprobe festzustellen. Die Methode ist in dieser Form nur bei mageren Tieren angängig; haben die Tiere eine sehr fette Haut, so ist es besser, sie getrennt zu verarbeiten.

Sind die Tiere aber fett, so bleibt kaum etwas anderes übrig, als sie vor der Extraktion einige Tage nach der Zerkleinerung mit Alkohol übergossen stehen zu lassen. Die Filtration und Abdampfung des alkoholischen, oft schmierigen Auszuges ist unbequem und langwierig. Die Organmasse wird dann nach vorsichtiger Verjagung des Alkohols wie oben getrocknet.

Wenn man Unterhautgewebe, Mesenterialfett oder sehr fette Organe (z. B. Haifischlebern) extrahieren will, so nehme man entweder nur so wenig wie möglich Substanz, da man sie doch erst in Alkohol kalt oder am Rückflußkühler behandeln muß, um die Filtration und Abdampfung sich durch die Verwendung geringer Mengen zu erleichtern, oder man kann diese Substanzen in etwas größerer Menge ausschmelzen. Das geschieht, indem man sie auf einen Filter bringt und das Fett in ein darunter stehendes Becherglas hineinfiltriert, wenn man die ganze Vorrichtung im Trockenschrank erwärmt. Da das Fett auch in den Depots nicht frei, sondern in Zellen eingeschlossen liegt, bedarf es nicht gar zu niedriger Temperaturen, um das Fett filtrationsfähig zu machen. Der Rest, die Grieben, werden dann in Alkohol ausgekocht. Der alkoholische Auszug wird hierauf abgedampft und getrocknet.

Beim Trocknen findet, wenn die Luft Zutritt hat, eine Erhitzung des Fettes statt, die eine Vermehrung der niederen Fettsäuren auf Kosten der hohen Fettsäuren zur Folge hat; auch tritt eine Bildung von Oxysäuren auf. Darum ist kalte Trocknung empfohlen worden, indem kleine Mengen Substanz im Exsikkator getrocknet werden, oder die Substanz erst, in Alkohol durch mehrere Tage kalt stehen gelassen, vom Wasser befreit wird. Sehr zweckmäßig ist es auch, die atmosphärische Luft auszuschließen, indem die Substanzen in Trockenschränken, die mit Leuchtgas gefüllt sind, getrocknet werden. Nachdem das zu extrahierende lufttrockene Pulver[1]) so vorbereitet ist, wird es der Extraktion unterworfen.

Von Extraktionsmethoden kommen in Frage: die Ätherextraktion nach *Soxhlet,* die *Liebermann*sche KHO-Aufschließungsmethode und die *Rosenfeld*sche Alkoholchloroformmethode.

Die einfache Ätherextraktion liefert, bis in ungemessene Stunden fortgesetzt, nicht die gesamte in einer Substanz vorhandene Fettmasse. Nebenbei ist das Extrakt auch nicht N-frei, wie es überhaupt kein Extrakt ist. Somit wäre sie stets als ungenau zu verwerfen. Für einen Zweck wende ich sie aber oft an: wenn es gilt, näher, als das ein mikroskopisches Präparat kann, den Verfettungsgrad der Leber in Zahlen auszudrücken, so extrahiere ich die Leber des Hundes — aber nur dieses Organ — und nur 4 Stunden mit Äthyläther. Da ich durch vielfache Untersuchungen weiß, daß die Leber des hungernden Hundes ca. 10% Fett (9—12%) in der lufttrockenen Substanz enthält, so ist die Tatsache, daß bei 4stündiger Ätherextraktion 15—20—25—75% Fett gefunden werden, für viele Zwecke ausreichend orientierend. Der erhaltene in Äther gelöste Extrakt wird abgedampft, in Petroläther gelöst, filtriert, der Petroläther verjagt. Um die Luft von dem sehr eingeengten Extrakte — zuerst schützt gewissermaßen die Ätheratmosphäre — abzuhalten, kann man die letzte Eindampfung auf dem Wasserbade im Erlenmeyerkölbchen — dem Philippsbecher — so vornehmen, daß man es mit einem doppeltdurchbohrten Gummistöpsel verschließt und durch den Kolben das Leuchtgas hindurch gehen läßt, das unter dem Wasserbade brennt. Es dürfen nur ganz geringe Mengen von Äther oder Petroläther dem Gase beigemischt werden, darum mäßige Erhitzung.

Diese Trocknungsmethode ist darum sehr gut, weil man den Extrakt, ohne Oxydation befürchten zu müssen, längere Zeit trocknen kann.

Die *Liebermann*sche Methode schließt das Organpulver erst in Kalilauge auf; die Vorschrift ist folgende: 5 *g* Substanz werden mit 30 cm^3 50%iger Kalilauge auf Asbestpappe eine halbe Stunde in einem weithalsigen Kolben gekocht.

Der Kolben hat unten an dem 3·6 *cm* weiten Halse eine Marke für 240 cm^3, der Hals ist ca. 20 *cm* lang. Dann wird die aufgeschlossene

[1]) Es wäre empfehlenswert, mit absolut trockener Substanz zu arbeiten, um wasserlösliche Stoffe auszuschließen, aber bei der Extraktion zieht das Organpulver etwas Wasser an.

Substanz (nicht immer ist alles aufschließbar!) abgekühlt. Jetzt werden 30 cm^3 90—94% igen Alkohols zugesetzt. Das Gemisch wird hierauf etwa 10 Minuten lang erwärmt. Jetzt wieder abkühlen und vorsichtiger Zusatz von 100 cm^3 20%iger Schwefelsäure (unter Umschwenken). Über die erkaltete Flüssigkeit schichtet man genau 50 cm^3 Petroläther (der beim Abdampfen keinen Rückstand hinterlassen darf), verschließt den Kolben mit einem weichen Stöpsel und schüttelt, ohne den Stöpsel zu lüften, alle 1—2 Minuten 10 Sekunden lang, was man 30mal wiederholt. Nun füllt man mit gesättigter Kochsalzlösung soweit auf, daß die Flüssigkeit unter dem Petroläther bis Marke 240 steht, schüttelt noch einige Male und läßt dann am kühlen Orte stehen. Von dem Petroläther werden 20 cm^3 abpipettiert, mit 40 cm^3 säurefreiem 90%igem Alkohol und 1 cm^3 einer 1%igen Phenolphthaleinlösung versetzt und mit alkoholischer $\frac{1}{10}$-Normalkalilauge titriert.

Der Petroläther + Alkohol + Phenolphthalein wird abgedampft, getrocknet, gewogen. Die Berechnung geschieht nach der Formel

$$F = \left(\frac{S - 0{\cdot}01 - (K \times 0{\cdot}00255)}{a}\right) 250,$$

dabei ist F der Fettgehalt in Prozenten.

S = der Rückstand.

K = die zur Titrierung verbrauchten Kubikzentimeter $\frac{n}{10}$-Kalilauge.

a = die angewandte Menge der Substanz in Grammen.

Die Methode ergibt etwa gleiche Werte mit der einfachen Ätherextraktion. Sie enthält in der Rechnung den Fehler, daß alle titrierten Säuren als Triglyzeride berechnet werden, als welche sie — z. B. Essigsäure — gar nicht vorkommen.

Die *Rosenfeld*sche Alkohol-Chloroformmethode ist sehr einfach. Man kocht in einem kleinen Becherglase die in einer Patrone befindliche Substanz, 5—20 *g* des trockenen Pulvers, über der man die Patrone mit einem dünnen Faden[1]) zugebunden hat — damit nachher im Chloroform die spezifisch leichtere Substanz nicht auf und nieder taucht —, 1/4 Stunde, wobei man dafür sorgt, daß der Alkohol nicht ganz verdampft — dann wird die Patrone mit der Substanz herausgehoben, abtropfen gelassen und in das Extraktionsrohr eingeführt. Dann wird mit Chloroform 6 Stunden lang extrahiert, und wiederum 1/4 Stunde mit Alkohol in einem zweiten Becherglase gekocht. Hierbei ist achtzugeben, daß das Becherglas bis zum Sieden des Alkohols ein wenig umgeschwenkt wird, weil sonst die Substanz stark zu stoßen pflegt, was zu Verlusten führen kann. Dann wieder herausheben, abtropfen lassen und im gleichen Extraktionsrohr mit demselben Chloroform noch 6 Stunden extrahieren. Zum Schluß wird das Chloroform abdestilliert und der Alkohol aus den beiden Bechergläsern abgedampft. Die Rückstände werden in absolutem Äther aufgenommen und

---

[1]) Nicht zu dicht über dem Pulver, damit bei etwaiger Quellung des Pulvers die Patrone nicht zerreißt.

in ein gewogenes Kölbchen abfiltriert. Beim Filtrieren gibt es einen kleinen geschickten Trick: das Fett zieht sich, wie bekannt, bis zum Rand des Filters in die Höhe. Wenn man es nicht mit einigen Tropfen Äther herunterspülen kann, so schneidet man mit Pinzette und Schere den Filterrand ab und legt ihn in die Spitze des Filters, wo er nun leicht auszuwaschen ist.

Wenn man nun noch in den Extrakten die verseifbaren Substanzen, also die eigentlichen Fette (vielleicht + Lezithin), von den unverseifbaren trennen will, um die Extraktmenge an verseifbarem Material zu bestimmen, so verfährt man folgendermaßen.

2—4 *g* Extrakt kocht man mit ca. 3 *g* Kalihydrat und 50 *g* nach *Wallot* gereinigtem Alkohol 1 Stunde am Rückflußkühler. Nachdem so alles Verseifbare verseift ist, verdampft man den Alkohol und kocht den Rückstand mit 100—150 *g* Wasser, wobei sich alles löst. Beim Erkalten scheiden sich Seifen aus, man führt in den Scheidetrichter über unter Zusatz von Alkohol bis zirka dem halben Volumen des zur Lösung verwendeten Wassers und schüttelt mit Petroläther aus. Der Äther setzt sich gut ab, wird von der Seifenlösung getrennt, filtriert und abdestilliert. Der Rückstand ergibt die unverseifbare Substanz, deren Menge, von dem Extrakt abgezogen, die Menge reinen Fettes ergibt.

Untersuchung auf hochmolekulare Alkohole.

Von **F. Röhmann**, Breslau.

Die hochmolekularen Alkohole, und zwar sowohl die Alkohole der Fettreihe wie die Cholesterine und Phytosterine, können in den Wachsarten bzw. den Fetten und Organextrakten im freien Zustande und in Form von Estern, nach den bisher vorliegenden Erfahrungen Estern der Fettsäuren, enthalten sein. Wie weit das eine oder andere der Fall ist, erfährt man durch die Acetylzahl des betreffenden Stoffes vor und nach der Verseifung (siehe S. 214).

Die Bestimmung der Gesamtmenge der in einem Fett etc. enthaltenen hochmolekularen Alkohole erfolgt nach S. 218.

1. Darstellung der Ester hochmolekularer Alkohole aus Sekreten und Organextrakten.

Die Abtrennung der Ester hochmolekularer Alkohole von den neben ihnen vorhandenen Stoffen gelingt in einer Reihe von Fällen mit Hilfe von Alkohol, Äther und anderen Fettlösungsmitteln, besonders dann, wenn sie in diesen schwerer löslich sind als die Fette, Lezithin und die anderen Stoffen, mit denen sie zusammen vorkommen. So erhält man aus dem Walrat den Palmitinsäurecethylester, das Cetin (Schmelzpunkt 55°), durch Umkristallisieren aus Alkohol oder Äther. Behandelt man, um ein anderes Beispiel zu nennen, das Bienenwachs mit Alkohol, so bleibt der Palmitinsäuremyricylester, das Myricin (Schmelzpunkt 72°), ungelöst, während freie Cerotinsäure u. a. in Lösung geht. Aus dem Alkoholextrakt des Blutserums lassen sich Cholesterinester gewinnen. Man schüttelt den Alkoholextrakt mit Äther aus und erwärmt den Ätherrückstand mit Essigäther. Beim Erkalten scheiden sich Lezithine ab. In Lösung bleiben die Cholesterinester. Sie werden nach Verdunsten des Essigäthers in Äther gelöst. Beim spontanen Verdunsten des Äthers kristallisieren sie aus. Durch fraktionierte Kristallisation aus Ätheralkohol läßt sich der Ölsäureester vom Palmitin- und Stearinsäureester trennen.[1])

[1]) *F. Röhmann* und *E. Hepner*, Über den Cholesteringehalt der Blutkörperchen. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **73**. S. 602 (1892).

In anderen Fällen gelingt die Trennung nicht. Das Wollfett z. B. läßt sich zwar durch Alkohol, Ätheralkohol u. a. in ein festeres und flüssigeres Estergemisch zerlegen, von denen ersteres die Ester von Cholesterin und Isocholesterin mit hochmolekularen Säuren, letzteres neben freiem Cholesterin Ester des Cholesterins, Isocholesterins und hochmolekularer Fettalkohole enthält, aber eine Isolierung bestimmter Ester gelingt anscheinend nicht. Auch Versuche aus dem Extrakt von Bürzeldrüsen, die Ester des Octadecylalkohols durch Fraktionierung zu trennen, führten nicht zum Ziel.

2. Nachweis der hochmolekularen Alkohole in Fetten und Wachsen nach der Verseifung.

a) Allgemeine Methoden.

Die Verseifung, welche der Isolierung der hochmolekularen Alkohole voranzugehen hat, geschieht im allgemeinen durch Kochen mit alkoholischer Kalilauge. Hat man kleinere Fettmengen zu untersuchen, so verwendet man wie bei der Bestimmung der Verseifungszahl auf 2 *g* Fett 25 *cm*³ halbnormaler alkoholischer Kalilauge und kocht eine Viertel- bis halbe Stunde. Bei größeren Mengen Fett wiegt man die entsprechende Menge Kalihydrat (auf 100 *g* etwa 30 *g* Kalium hydricum) ab, löst sie in der etwa eineinhalbfachen Menge Wasser, übergießt das Fett in einem Kolben mit der zehnfachen Menge Alkohol, trägt das gelöste Kalihydrat ein und erhitzt auf dem Wasserbade am Rückflußkühler etwa eine Stunde zum Sieden.

Nach *A. Kossel* und *R. Obermüller*[1]) kann man auch mit Natriumalkoholat verseifen (siehe unten). Das Verfahren ist teurer und scheint meistens keine wesentlichen Vorteile zu bieten.

Hat man größere Mengen eines Fettes oder Wachses auf hochmolekulare Alkohole zu verarbeiten, so empfiehlt es sich, nach der Verseifung mit alkoholischer Kalilauge die Hauptmenge der Fettsäuren aus der alkoholischen Lösung abzuscheiden. Man kann zu diesem Zweck die alkoholische Lösung mit Salzsäure neutralisieren und mittelst Chlorcalcium die Fettsäuren als Kalksalze fällen oder man setzt die berechnete Menge Barythydrat, die man in heißem Wasser gelöst hat, hinzu und neutralisiert mit der berechneten Menge Essigsäure.

Auch eine Verseifung mit einer methylalkoholischen Barytlösung im Druckgefäß wäre gelegentlich zu versuchen.

Die hochmolekularen Alkohole können sich, wenn sie, wie in den Wachsarten, in größerer Menge vorhanden sind, schon beim Verseifen aus der alkoholischen Lösung ausscheiden und durch Abfiltrieren gewinnen lassen. In manchen Fällen scheiden sich beim Verseifen auch in Alkohol schwer lösliche Kaliseifen aus, denen sie erst durch Behandeln mit Äther u. a. entzogen werden müssen.

---

[1]) Eine neue Methode zur Verseifung von Fettsäureäthern. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **14**. S. 599 (1890); Bd. **15**. S. 321 (1891).

Ist die Menge der hochmolekularen Alkohole geringer, so werden sie beim Verseifen mit alkoholischer Kalilauge durch den Alkohol und die Seifen in Lösung gehalten. Um sie zu gewinnen, verfährt man wie bei ihrer Bestimmung nach S. 218. Weniger empfehlenswert ist im allgemeinen die ältere Methode, bei der z. B. Cholesterin aus der wässerigen Seifenlösung, also nach Verdunsten des Alkohols und Lösen des Rückstandes in Wasser, mit Äther ausgeschüttelt wurde.

Hat man die Seifen als Calcium- oder Barytseifen abgeschieden, so ist das Filtrat der Seifen nach dem Einengen mit Äther oder Petroläther zu extrahieren, zugleich sind aber auch den Seifen die mitgerissenen Alkohole zu entziehen. Man kocht sie mit Alkohol aus, engt die alkoholischen Extrakte ein und schüttelt diese nach Zusatz der entsprechenden Menge Wasser mit Petroläther.

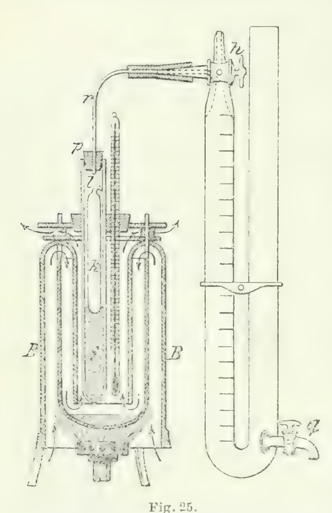


Fig. 25.
Apparat zur Bestimmung hochmolekularer Fettalkohole nach *Hell*.

Die weitere Untersuchung auf hochmolekulare Alkohole geht folgendermaßen vor sich: Man prüft zunächst den Äther bzw. Petrolätherrückstand auf Seifen. Hierzu verascht man eine kleine Menge auf einem Platinlöffel, löst den häufig kaum sichtbaren Rückstand in wenig Wasser und sieht, ob er rotes Lakmoidpapier bläut bzw. ob er Reaktion auf Calcium oder Baryum gibt. Bei Anwesenheit von Kaliseifen löst man den Rückstand noch einmal in Petroläther und schüttelt mit Wasser oder verdünntem Alkohol. Enthält der Ätherrückstand Calcium- oder Baryumseifen, so hat man ihn nach dem Lösen in Petroläther erst mit verdünnter Salzsäure und Wasser, dann mit verdünntem Alkali zu schütteln.

In dem seifenfreien Rückstand bestimmt man den Schmelzpunkt. Eine Probe kristallisiert man aus heißem Alkohol und untersucht die sich ausscheidenden Kristalle unter dem Mikroskop (siehe Fig. 26 u. 28) im Tageslicht und im polarisierten Licht. Hat man genügende Mengen Substanz, so bestimmt man das Drehungsvermögen und die Jodzahl und führt in das Acetat über. Man bestimmt die Acetylverseifungszahl. Aus dem Vergleich der letzteren mit der Jodzahl erfährt man, ob neben jodbindenden hochmolekularen Alkoholen, z. B. Cholesterin, andere nicht jodbindende Alkohole vorhanden sind. Weiterhin stellt man sich durch Erhitzen mit den Säurechloriden Ester dar, besonders das Benzoat, und untersucht diese (vgl. Isocholesterin S. 255).

Zur Prüfung auf Alkohole der Fettreihe und deren Bestimmung dient das Verfahren von *Hell*.[1]) Es beruht auf der Erfahrung, daß Alkohole der Fettreihe beim Erhitzen mit Natronkalk unter Entwicklung von Wasserstoff in die entsprechenden Fettsäuren übergehen:

$$R.CH_2OH + NaOH = R.COONa + 2H_2.$$

Verfahren von *C. Hell*.[2]) 2—10 *g* Wachs werden in einem Porzellantiegel geschmolzen und mit dem gleichen Gewicht gekörntem, vorher in einer Silberschale entwässertem Alkali versetzt. Das Wachs wird von dem Alkali augenblicklich aufgesaugt. Nach dem Abkühlen pulvert man die erstarrte Masse sorgfältig, mischt sie mit 3 Teilen Kalikalk (aus 1 Teil Kalihydrat und 2 Teilen Kalk bestehend) auf je 1 Teil abgewogenen Wachses und führt das Gemisch in das Rohr *i* (Fig. 25) ein. Um das durch Erwärmung und Druckveränderung ausdehnbare Luftvolumen möglichst zu vermindern, wird das leere an beiden Enden zugeschmolzene Rohr *k* in *i* eingeschoben. *i* ist durch das Glasrohr *r* mit einer *Hofmann*schen Gasbürette verbunden, die mit Quecksilber gefüllt ist und oben durch den Dreiweghahn *h* verschlossen werden kann.

Man setzt zunächst durch den Hahn *h* die Röhre *i* mit der äußeren Luft in Verbindung, beobachtet Barometerstand und Zimmertemperatur und verbindet *i* durch Drehen des Hahnes *h* mit der Bürette. Jetzt läßt man etwas Quecksilber mittelst des Hahnes *q* ab und erhitzt das Luftbad auf 260—280°. Das Quecksilber fällt. Bleibt nach einiger Zeit das Quecksilberniveau konstant, trotzdem die Temperatur auf 300—310° gestiegen ist, so ist die Zersetzung beendigt. Man läßt nun den Apparat bis zur Anfangstemperatur erkalten, stellt den ursprünglichen Druck durch Zugießen von Quecksilber wieder her, liest das Gasvolumen ab und reduziert es auf 0° und 760 *mm* Barometerstand. Das Gas wird unter Berücksichtigung der Tension des Wasserdampfes feucht gemessen. Besser ist es, das Gas zu trocknen, indem man das Rohr *i* länger wählt und über die Luftverdrängungsröhre *k* noch eine Schicht stark geglühten Natronkalks bringt.

Die Menge des Wasserstoffs ist das Maß für die Menge der Fettalkohole. Enthält das Fett bzw. das Wachs nur einen bestimmten Alkohol, so läßt sich aus dem gewonnenen Wasserstoff seine Menge berechnen.

Kohlenwasserstoffe, die, wie in manchen Wachsarten, neben Fettalkoholen vorhanden sind, finden sich in der Kalischmelze und lassen sich ihr durch Extraktion mit Äther u. a. entziehen. Hierbei ist nur zu beachten, daß bei etwas höherer Temperatur aus den Salzen der Fettsäuren durch Erhitzen mit Alkalien auch Kohlenwasserstoffe entstehen:

$$R.COOK + KOH = RH + CO_3K_2.$$

Cholesterin wird beim Erhitzen mit Alkalien nur wenig angegriffen. *Lewkowitsch*[3]) benutzt dies zur Trennung von Cholesterin und Fettalkoholen.

Das Erhitzen mit Kali dient auch zur Identifizierung der Fettalkohole. Man erhitzt wie bei der Methode von *Hell* mit Kalikalk und zerlegt die Schmelze mit Salzsäure. Die Fettsäure wird abfiltriert und durch Umkristallisieren aus Ätheralkohol gereinigt. Cholesterin und Kohlen-

[1]) Über eine Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Atomigkeit höherer Fettalkohole. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. 223. S. 269 (1884).

[2]) Siehe *Ubbelohde*, Handbuch d. Chemie u. Technologie d. Öle und Fette. Leipzig 1908. S. 291.

[3]) Handbuch. I. S. 413.

wasserstoffe bleiben in der Mutterlauge. Es wird sich aber wohl stets empfehlen, die Säure noch einmal in ein Salz überzuführen und dieses mit heißem Alkohol, Äther oder Petroläther zu behandeln.

Überführung von Oktadezylalkohol in Stearinsäure.[1]) 2 *g* Oktadezylalkohol wurden etwa 20 Stunden mit 8 *g* Natronkalk auf 270—280° erhitzt. Die Masse wurde mit Alkohol verrieben und unter Erwärmen mit Salzsäure behandelt, dann mit Wasser verdünnt und abkühlen gelassen. Die rohe Stearinsäure wurde mit Wasser gewaschen, in Methylalkohol gelöst und durch methylalkoholische Barytlösung als Baryumsalz gefällt. Dieses wurde mit Äthylalkohol ausgekocht, dann mit Salzsäure zerlegt und mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser geschüttelt, der Äther filtriert und der Ätherrückstand aus Alkohol umkristallisiert.

Eine andere Methode zur Feststellung der Natur eines Fettalkohols beruht darauf, daß man seinen Palmitinsäureester bei erniedrigtem Druck destilliert und den hierbei gebildeten ungesättigten Kohlenwasserstoff mit dem entsprechenden bekannten Kohlenwasserstoff vergleicht[2]):

$$C_m H_{2m+1} . COO . C_n H_{2n+1} = C_n H_{2n} + C_m H_{2m+1} . COOH.$$

b) Cholesterin und Phytosterin.

Zur Gewinnung von Cholesterin und Phytosterin kann man die Seifenlösung mit Wasser verdünnen und mit Äther schütteln. Hierbei bilden sich leicht äußerst lästige Emulsionen. Um sie zu vermeiden, muß man mit ganz bestimmten Mengenverhältnissen arbeiten.

Verfahren von *A. Bömer.*[3]) 50 *g* Fett werden in einem Erlenmeyerkolben von etwa 1 *l* Inhalt auf dem Wasserbade geschmolzen und mit 100 *cm*³ alkoholischer Kalilauge (200 *g* Kalihydrat in 1 *l* Alkohol von 70° Tr.[4]) auf dem kochenden Wasserbade am Rückflußkühler — als solcher kann ein etwa ³/₄ *m* langes, hinreichend weites Glasrohr dienen — verseift, wobei man anfangs häufig und kräftig umschüttelt, bis der Kolbeninhalt beim Schütteln klar geworden ist, und dann noch eine halbe bis eine Stunde unter zeitweiligem Umschütteln die Seife auf dem Wasserbade erwärmt. Darauf gibt man die Seifenlösung noch warm in einen Schütteltrichter von etwa 1 bis 1¹/₂ *l* Inhalt und spült die im Kolben verbliebenen Seifenreste mit 200 *cm*³ Wasser in den Schütteltrichter. Nachdem die Seifenlösung hinreichend abgekühlt ist, setzt man 500 *cm*³ Äther hinzu und schüttelt den Inhalt etwa eine halbe bis eine Minute unter mehrmaligem Öffnen des Hahnes oder Stopfens kräftig durch. Nachdem die Mischung 2—3 Minuten der Ruhe überlassen ist, hat sich die Ätherlösung vollständig klar abgesetzt. Man trennt sie in der üblichen Weise von der Seife, filtriert, wenn nötig, um etwa vorhandene geringe Wassermengen zu entfernen, in einen geräumigen Erlenmeyerkolben und destilliert den Äther nach Zusatz von 1—2 Bimssteinstückchen ab. Die Seife schüttelt man noch 2- oder 3mal in derselben Weise mit 200—250 *cm*³ Äther aus, gibt die Ätherlösung

[1]) *Dumas* und *Stas*, Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. 35. S. 129 (1840). — *F. Röhmann*, Über das Sekret der Bürzeldrüsen. *Hofmeisters* Beiträge z. Physiol. Bd. 5. S. 116 (1904).

[2]) *F. Krafft*, Darstellung höherer Olefine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **16**. S. 3018 (1883).

[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. Jg. **1898**. S. 38; siehe auch *E. Salkowski*, Über die Isolierung des Cholesterins aus Fetten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 57. S. 515 (1908).

[4]) Es empfiehlt sich, Alkohol und Kalilauge erst vor dem Gebrauch zu mischen, und zwar 30 *cm*³ Kalilauge, 2 : 3 Wasser und 70 *cm*³ 95%igen Alkohol.

jedesmal zu dem Destillationsrückstand der vorhergehenden Ausschüttelung und destilliert die Auszüge in derselben Weise ab. Nach dem Abdestillieren des Äthers bleiben in dem Kolben in der Regel geringe Mengen Alkohol zurück. Man entfernt dieselben durch Eintauchen in das kochende Wasserbad unter Einblasen von Luft und verseift den vorwiegend aus Cholesterin (bzw. Phytosterin) und der durch den Äther gelösten Seife bestehenden Rückstand zur Entfernung etwa noch vorhandener geringer Mengen unverseiften Fettes nochmals mit 10 *cm*³ obiger Kalilauge etwa 5—10 Minuten im Wasserbade am Rückflußkühler (wie oben angegeben). Den Inhalt des Kolbens führt man alsdann sofort in einen kleinen Scheidetrichter über, spült mit 20 *cm*³ Wasser nach, setzt nach hinreichendem Erkalten 80—100 *cm*³ Äther hinzu und schüttelt etwa eine halbe bis eine Minute kräftig durch. Nachdem sich (etwa in 2—3 Minuten) die Ätherlösung klar abgesetzt hat, läßt man die unterstehende, wässerig-alkoholische Schicht abfließen und wäscht die Ätherlösung dreimal mit 5—10 *cm*³ Wasser. Nach dem Ablaufen des letzten Waschwassers filtriert man den Äther zur Entfernung etwa vorhandener Wassertröpfchen in ein kleines Becherglas oder Erlenmeyerkölbchen und dunstet oder destilliert den Äther langsam ab.

Beim Trocknen im Wasserbade erhält man einen festen, bei tierischen Fetten schönstrahlig kristallinischen Rückstand, welcher das Cholesterin bzw. Phytosterin enthält und aus denen diese Körper durch Umkristallisieren aus absolutem Alkohol rein dargestellt werden.

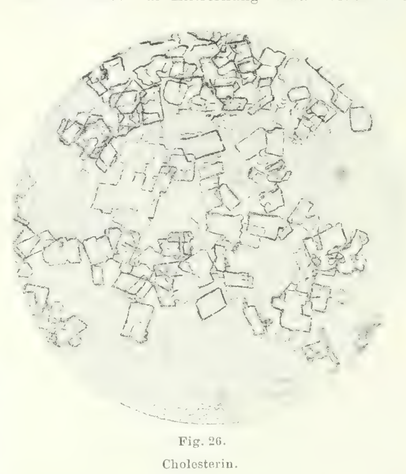


Fig. 26.
Cholesterin.

E. Ritter[1]) löst zur Darstellung von Cholesterin und Phytosterin 50 *g* Fett in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade in 100 *cm*³ Alkohol und fügt zur Verseifung nach *Kossel-Obermüller*[2]) 8 *g* Natrium, die zuvor in 160 *cm*³ Alkohol gelöst worden waren, hinzu. Die Seife wird auf dem Wasserbade erwärmt, bis der Alkohol entwichen ist. Dann fügt man das etwa eineinhalbfache Gewicht des verwendeten Fettes an Kochsalz und soviel Wasser hinzu, daß sich der Inhalt der Schale ganz oder zum größten Teile auflöst. Es wird nun unter häufigem Umrühren zur Trockne verdampft, erst über kleiner Flamme, dann auf dem Wasserbade, schließlich im Trockenschrank bei etwa 80°. Man bringt die Masse allmählich, indem man noch weiter im Trockenschrank, schließlich im

---

[1]) *E. Ritter*, Über die Methoden, die zur Abscheidung der Cholesterine aus den Fetten und zu ihrer quantitativen Bestimmung verwendbar sind. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **34**. S. 448 (1901).

[2]) *A. Kossel* und *K. Obermüller*, Eine neue Methode zur Verseifung von Fettsäure-Äthern. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **14**. S. 599; Bd. **15**. S. 321 (1891).

Exsikkator über Schwefelsäure trocknet, in Pulverform und extrahiert in einem geräumigen Soxhletapparat 9 Stunden mit Äther. Man gießt dann den Ätherextrakt in einen trockenen Erlenmeyerkolben von $^3/_4$—1 *l* Inhalt. Der Äther wird abdestilliert und der Destillationsrückstand in ganz wenig Alkohol gelöst. Alsdann gießt man unter Umschwenken nach und nach soviel Wasser zu, bis der Erlenmeyerkolben annähernd gefällt ist, bringt die gefällte Substanz auf ein Papierfilter und wäscht mit reinem Wasser etwas nach.

Zur Trennung des Phytosterins vom Stigmasterin benutzte *Windaus* die verschiedene Löslichkeit, welche die Bromverbindungen der Acetate zeigen, nachdem schon früher die Löslichkeit des Cholesterinbromids in Petroläther zur Trennung vom Koprosterin benutzt worden war.[1] Das Cholesterinbromid ist aber bei weitem weniger beständig als das Bromid des Acetates, so daß die Bromierung der Acetate stets der direkten Bromierung vorzuziehen ist, wenn man das Cholesterin, ähnlich dem Stigmasterin, von anderen hochmolekularen Alkoholen trennen will.

Trennung des Phytosterins vom Stigmasterin nach *Windaus* und *A. Hauth*.[2]) Das aus der Kalabarbohne gewonnene Rohphytosterin wird in der üblichen Weise mit Essigsäureanhydrid acetyliert. 20 *g* getrocknetes Acetylprodukt werden in 200 cm^3 Äther gelöst und mit 250 cm^3 einer Brom-Eisessigmischung versetzt (5 *g* Brom in 100 cm^3 Eisessig). Alsbald fielen kleine, derbe Kristalle aus, die nach zweistündigem Stehen der Lösung abfiltriert wurden. Sie bestanden aus dem Tetrabromid des Stigmasterinacetats. Das Filtrat enthält das Bromadditionsprodukt des Phytosterins. Zu seiner Darstellung wird die Lösung in kleinen Portionen mit 200 *g* 4%igem Natriumamalgam versetzt und darauf nach dem Entfernen des Quecksilbers und dem Abdestillieren des Äthers noch mit 10 *g* Zinkstaub zwei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Abfiltrieren des Zinkstaubs wurde das Acetat durch Zusatz von Wasser ausgefällt und durch vierstündiges Kochen mit 200 cm^3 einer 10%igen alkoholischen Kalilauge verseift. Beim Abkühlen der Lösung fielen glänzende Kristallblätter aus, deren Menge beim vorsichtigen Zusatz von Wasser noch vermehrt werden konnte.

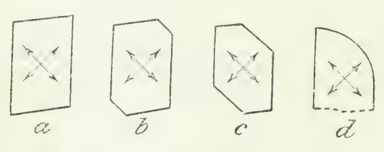


Fig. 27.
Kristallformen des Cholesterins nach *A. Bömer*.

a) Cholesterin.

Cholesterin, $C_{27}H_{45}(OH)$ oder $C_{27}H_{43}(OH)$, ist unlöslich in Wasser, löslich in 9 Teilen siedendem Alkohol von 0·84 spez. Gew., 5·55 Teilen kochendem Alkohol von spez. Gew. 0·82, ist leicht löslich in Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, weniger in Petroläther. Kristallisiert aus Chloroform, wasserfreiem Äther oder Essigäther in feinen, seidenglänzenden Nadeln,

[1]) *St. Bondzynski* und *V. Humnicki*, Über das Schicksal des Cholesterins im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **22**. S. 407 (1896).

[2]) *A. Windaus* u. *A. Hauth*, Notiz über Phytosterin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 3681 (1907). — *A. Hauth*, Zur Kenntnis des Phytosterins. Inaug.-Diss. Freiburg i. B. 1907.

aus heißem, 94%igem Alkohol in großen, „rhombischen Tafeln"[1]) (siehe Fig. 27) mit einem Molekül Kristallwasser, das in trockener Luft oder bei 100° C verloren geht. Schmelzpunkt 147·5° (unkorr.) [α] D für wasserfreies Cholesterin in 2—8%iger Chloroformlösung —36·6° + 0·249 p^2), in 2%iger ätherischer Lösung —31·12°, in 6%iger ätherischer Lösung —29·61°. *(R. Burian).*

Reaktionen. 1. Bringt man unter dem Mikroskop zu Cholesterinkristallen Schwefelsäure (1 Teil konzentrierte Schwefelsäure und 2 Teile Wasser), so schmelzen diese, indem sich die Ränder zuerst gelb bis gelbrot färben. Durch Schwefelsäure und etwas Jodjodkaliumlösung färben sich die Kristalle violett, blau grün oder rot.

2. *E. Salkowskis* Probe. Löst man Cholesterin in Chloroform und fügt konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so färbt sich die Chloroformlösung schnell kirschrot. Die darunter befindliche Schwefelsäure zeigt grünliche Fluoreszenz.

3. *C. Liebermann-Burchards* Probe. Cholesterin wird im trockenen Reagenzglase in wenig Chloroform und einigen Tropfen Essigsäureanhydrid gelöst. Die Lösung wird unter Abkühlen tropfenweise mit reiner konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Sie wird zuerst rosenrot, doch verschwindet die Farbe schnell, um auf Zusatz einer neuen kleinen Menge Schwefelsäure einer schönen, ziemlich beständigen Blaufärbung Platz zu machen.

Ester des Cholesterins[3]): Acetat, Schmelzpunkt 114—114·4, [α] D in Chloroformlösung —43·2°. Bromcholesterinacetat, Schmelzpunkt 115·4 bzw. 117·6, dimorph, [α]D—45°. Es lösen sich in 100 Teilen 94%igen Alkohols 1·12 *g* Cholesterin, 2·2 *g* Cholesterinacetat, 0·35 *g* Bromcholesterinacetat (Chosaburo-Kusumoto). Das Bromcholesterinacetat ist beständig, während das Cholesterindibromid allmählich verharzt.

Das Benzoat schmilzt bei 145·5° zu einer trüben durchscheinenden Flüssigkeit, bei weiterem Erhitzen wird diese bei 178·5° plötzlich klar. Beim Abkühlen wird die Schmelze vorübergehend tiefblau, dann trübe, noch einmal violettblau und erstarrt unter Verschwinden der Farbenerscheinung. Ähnlich verhalten sich beim Abkühlen auch das geschmolzene Acetat und besonders das Propionat. Das Benzoat ist schwer löslich in Äther, noch schwerer in Alkohol, leicht in Schwefelkohlenstoff. Es kristallisiert in rhombischen Oktaedern.[4])

Das Zinnamylat kristallisiert in charakteristischen Tafeln, Schmelzpunkt 149°.[5])

---

[1]) Vgl. *A. Bömer,* Über Gewinnung und Kristallformen von Cholesterin und Phytosterin aus Fetten. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. Jg. **1898**. S. 41.

[2]) *Hesse,* Über Phytosterin und Cholesterin. Ann. d. Chemie u. Pharm. Bd. **192**. S. 175 (1878).

[3]) *F. Reinitzer,* Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. Monatsh. f. Chem. Bd. **9**. S. 421 (1888); *K. Obermüller,* Weitere Beiträge zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **16**. S. 143 (1891).

[4]) Kristallographische Untersuchungen von *A. Fock,* siehe *K. Obermüller,* Inaug.-Diss. Berlin 1892. S. 62.

[5]) *St. Bondzynski* und *V. Humnicki,* Über das Schicksal des Cholesterins im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **22**. S. 403 (1896). Andere Ester siehe *K. Obermüller,* Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. Inaug.-Diss. Berlin 1892.

Cholesterylpalmitat: Man erhitzt 1 Teil Palmitinsäure mit 3—5 Teilen Cholesterin 3 Stunden auf 180—200°, löst in Äther unter Erwärmen und fällt mit 94°/₀igem Alkohol. Den Niederschlag kristallisiert man aus Ätheralkohol um. Schmelzpunkt 77·5°.

Cholesterylstearat wird wie das Palmitat dargestellt. Schmelzpunkt 82°. Palmitat und Stearat sind schwerer löslich als das Oleat.

Cholesteryloleat: Man erhitzt 1 Teil Cholesterin mit 3 Teilen Ölsäure in einer Kohlensäureatmosphäre 3 Stunden auf 170°. Nach dem Erkalten fügt man Alkohol zu dem Gemisch. Das Oleat scheidet sich als Sirup aus, der bald kristallinisch erstarrt und sich durch Umkristallisieren aus Ätheralkohol leicht reinigen läßt.[1]) Schmelzpunkt 41—45° [α] D—18·8°.

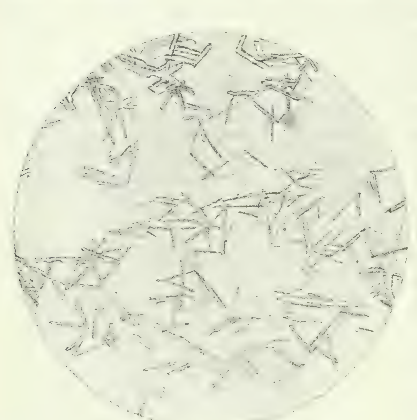


Fig. 28.

Phytosterin nach *J. Marcusson.*

Die Reaktion der Fettsäurecholesterinester mit Chloroform und Schwefelsäure verläuft ähnlich wie beim Cholesterin, jedoch nach *E. Salkowski* mit dem Unterschied, daß die Purpurfärbung bzw. kirschrote Färbung des Chloroforms nicht zur Entwicklung kommt; die Färbung bleibt vielmehr ein stumpfes Rot. Auch die Reaktion mit Jod und Schwefelsäure zeigt gewisse Unterschiede *(C. Hürthle).*

Darstellung von Cholesterin: *a)* aus Gallensteinen. Die Steine werden zerrieben und mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand wird aus siedendem Alkohol umkristallisiert:

b) aus Gehirn: Das frische Organ wird fein zerkleinert und mit etwas Sand und der dreifachen Gewichtsmenge Gips gemischt. Nach einigen Stunden erhärtet das Ganze zu einer festen Masse, die leicht zerrieben werden kann. Sie wird wiederholt bei Zimmertemperatur mit Aceton extrahiert. Der nach Abdestillieren des Acetons erhaltene Rückstand wird aus Acetonalkohol umkristallisiert.[2])

[1]) *F. Röhmann,* Anleitung zum chemischen Arbeiten. Berlin 1904. S. 63; *C. Hürthle,* Über die Fettsäure-Cholesterinester des Blutserums. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **21**. S. 349 (1895); *E. Salkowski,* Arbeiten aus dem path. Institut. Berlin 1906; *H. Pribram,* Beitrag zur Kenntnis des Schicksals des Cholesterins und der Cholesterinester im tierischen Organismus. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 413 (1906).

[2]) *O. Rosenheim,* On the preparation of cholesterin from brain. Zentralbl. f. Physiol. Bd. **20**. S. 188 (1906); siehe auch *R. Bünz,* Zeitschr. f. physiol. Chem. Über das Vorkommen von Cholesterinestern im Gehirn. Bd. **46**. S. 48 (1905).

b) Phytosterine.

Phytosterin (Sitosterin) $C_{27}H_{43}OH$ oder $C_{27}H_{45}OH$, kristallisiert aus Alkohol in äußerst dünnen, meistens etwas langgezogenen Tafeln mit 1 Molekül Kristallwasser (siehe Fig. 29) aus Äther in wasserfreien Nadeln.[1])

Schmelzpunkt 137·5 $[\alpha]_D^{20}$ in 2·5%iger ätherischer Lösung —26·7°, in Chloroform —33·91°.

Das Phytosterin gibt sehr ähnliche Farbenreaktionen wie das Cholesterin.

Ester des Phytosterins: Acetat: Schmelzpunkt 127°. Benzoat: Schmelzpunkt 145·5°. Es kristallisiert aus Ätheralkohol in rechtwinkligen Täfelchen, die im Unterschied zu den quadratischen des Cholesterinbenzoats länger als breit sind. Geschmolzenes Sitosterinacetat und -benzoat zeigen beim Abkühlen kein Farbenspiel.

Phytosterinacetatprobe.[2]) Das aus 50 oder besser aus 100 *g* Fett gewonnene Rohcholesterin löst man in möglichst wenig absolutem Alkohol und führt es unter Nachspülen mit geringen Mengen Alkohol in ein kleines Kristallisationsschälchen über und läßt kristallisieren. Man prüft die Kristalle mikroskopisch, verdunstet dann den Alkohol vollständig auf dem Wasserbade, setzt 2—3 cm^3 Essigsäureanhydrid hinzu, erhitzt, unter

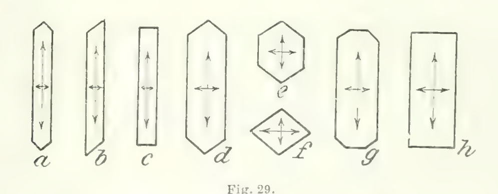


Fig. 29.

Kristallformen des Phytosterins nach *A. Bömer*

Bedeckung des Schälchens mit einem Uhrglase auf dem Drahtnetze etwa eine Viertelminute zum Sieden und verdunstet nach Entfernen des Uhrglases den Überschuß des Essigsäureanhydrids auf dem Wasserbade. Darauf erhitzt man den Inhalt des Schälchens unter Bedeckung mit einem Uhrglase mit soviel absolutem Alkohol, wie zur Lösung des Esters erforderlich ist und überläßt die klare Lösung — bis zum Erkalten auf Zimmertemperatur unter Bedeckung mit einem Uhrglase — der Kristallisation.

Nachdem die Hälfte bis zwei Drittel der Flüssigkeit verdunstet und der größte Teil des Esters auskristallisiert ist, filtriert man die Kristalle durch ein kleines Filter ab und bringt den noch in der Schale befindlichen Rest mit Hilfe eines kleinen Spatels und durch zweimaliges Aufgießen von 2—3 cm^3 95%igem Alkohol gleichfalls auf das Filter. Den Inhalt des Filters bringt man wieder in das Kristallisationsschälchen zurück, löst denselben je nach seiner Menge in 2—10 cm^3 absolutem Alkohol und läßt wiederum

[1]) *E. Salkowski,* Beiträge zu den Untersuchungsmethoden des Lebertrans und der Pflanzenöle. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **26**. S. 557 (1887); *R. Burian,* Monatsh. f. Chem. Bd. **18**. S. 551 (1897); *A. Bömer,* Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel. S. 45. 1898; *E. Ritter,* Beiträge zur Kenntnis des Sitosterins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **34**. S. 466 (1901).

[2]) *E. Salkowski,* Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **26**. S. 557 (1887).

kristallisieren. Nachdem der größte Teil des Esters auskristallisiert ist, filtriert man abermals ab und kristallisiert weiter in derselben Weise solange um, wie die Menge des Esters ausreicht. Von der dritten Kristallisation an bestimmt man den Schmelzpunkt des Esters und wiederholt diese Bestimmung bei jeder folgenden Kristallisation. Schmilzt das Estergemisch oberhalb 116° C, so kann es Phytosterinacetat enthalten.

Stigmasterin[1]), $C_{30}H_{48}O$ oder $C_{30}H_{50}O$, kristallisiert wie das Phytosterin mit 1 Molekül Kristallwasser, ist dem Phytosterin isomorph und bildet mit ihm Mischkristalle. Schmelzpunkt 170°. $[\alpha]_D^{21}$ in Chloroform — 45·01, in Äther —44·67°. Es gibt die Farbenreaktionen in gleicher Weise wie Cholesterin. Zu seiner Darstellung wird das Tetrabromacetat, das, wie oben beschrieben, aus dem Extrakt der Kalabarbohne gewonnen wurde, aus heißem Chloroform unter Zusatz von Alkohol umkristallisiert und durch Kochen mit Zinkstaub und Eisessig entbromt. Das Acetat wird mit alkoholischer Kalilauge gekocht, beim Zusatz von Wasser scheidet sich das Stigmasterin aus und wird aus Alkohol umkristallisiert.

Acetat: Schmelzpunkt 141°. Tetrabromstigmasterinacetat zersetzt sich bei 211—212°. Propionat: Schmelzpunkt 122°. Propionattetrabromid: Schmelzpunkt 202° unter Zersetzung, Benzoat: Schmelzpunkt 160°.

c) Koprosterin.

Das Koprosterin, $C_{27}H_{47}(OH)$, wurde von *St. Bondzynski* und *V. Humnicki*[2]) aus dem Alkoholextrakt getrockneter, menschlicher Fäzes nach dem Verseifen durch Schütteln mit Äther gewonnen und durch Umkristallisieren aus 85—90%igem Alkohol gereinigt (Trennung von Cholesterin, siehe oben S. 250). In ähnlicher Weise erhielten sie Hippokoprosterin aus den Fäzes der Pferde.

Koprosterin ist unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, sehr leicht löslich in Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol und Petroläther. Aus Alkohol kristallisiert es in langen feinen Nadeln. Schmelzpunkt 95—96°. $[\alpha]D + 24°$. Mit Chloroform und konzentrierter Schwefelsäure gibt Koprosterin anfangs nur eine gelbliche Färbung, welche erst allmählich und nach längerem Stehen orangerot und dunkelrot wird, während das Cholesterin unter denselben Umständen sofort eine blutrote Färbung gibt.

In Essigsäureanhydrid gelöst gibt Koprosterin bei Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure sofort eine Blaufärbung, welcher bald eine Grünfärbung nachfolgt.

Koprosterin addiert kein Brom oder Jod.

Acetylkoprosterin, in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln leicht löslich, kristallisiert in Nadeln vom Schmelzpunkt 85°. Benzoylkoprosterin ist in Äther leicht, in Alkohol fast gar nicht löslich, kristallisiert aus Ätheralkohol in rechtwinkligen Tafeln vom Schmelzpunkt 114—115°.

---

[1]) *A. Windaus,* a. a. O.

[2]) Über das Schicksal des Cholersterins im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22. S. 396 (1896).

Zinnamylkoprosterin, durch Zusammenschmelzen des Koprosterins mit Zinnamylchlorid auf 130° erhalten, kristallisiert aus Ätheralkohol in rechtwinkligen Säulen vom Schmelzpunkt 169°. Zinnamylkoprosterinbromid. Schmelzpunkt 165—166° C.

Hippokoprosterin scheidet sich aus heißer, konzentrierter alkoholischer Lösung als Gallerte ab, welche unter dem Mikroskop sich als aus kurzen Nädelchen bestehend erweist. Schmelzpunkt 74—75° C. In Chloroform gelöst gibt es bei Zusatz von Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zuerst intensive Violett-, dann bald Grünfärbung. Es addiert kein Brom und dreht in Äther gelöst schwach rechts. Es ist anscheinend kein reiner Körper.[1])

d) Isocholesterin.

Isocholesterin, $C_{26}H_{43}(OH)$, wurde von *E. Schulze*[2]) aus dem Wollfett durch Verseifen und Ausschütteln mit Äther zusammen mit Cholesterin und anderen kohlenstoffärmeren Alkoholen gewonnen. Zur Trennung des Isocholesterins von Cholesterin und den anderen Alkoholen dient das Benzoat. Man erhitzt das Gemisch der Alkohole mit Benzoylchlorid im Ölbade auf 140—160° C.[3]) Die Reaktion ist in wenigen Minuten beendet. Man löst die Masse in Äther und fällt das Benzoat mit 96°/₀igem Alkohol. Das Benzoat läßt man aus Ätheralkohol kristallisieren; das Cholesterinbenzoat scheidet sich in großen tafelförmigen Kristallen, das Isocholesterylbenzoat in Nadeln aus, die sich von denen des Cholesterinbenzoats durch Schlämmen trennen lassen. Durch Verseifen des Isocholesterinbenzoats wird das reine Isocholesterin gewonnen.

Das Isocholesterin kristallisiert aus Äther und Aceton in feinen Nadeln. Aus verdünnter alkoholischer Lösung scheidet es sich in weißen Flocken ab, eine konzentrierte alkoholische Lösung erstarrt beim Erkalten zu einer durchscheinenden Gallerte. Schmelzpunkt 138·5. $[\alpha]D + 59·7°$. Es gibt nicht die Reaktion mit Chloroform und Schwefelsäure. Mit Chloroform und Essigsäureanhydrid gibt es zunächst eine gelbe, dann rotgelbe Farbe mit grüner Fluoreszenz.

Isocholesterin addiert zwei Atome Brom. Das Benzoat schmilzt bei 194—195°.

---

[1]) Vgl. auch *G. Gittelmacher-Wilenko,* Über Hippokoprosterine. Jahresber. f. Tierchemie. Bd. **35**. S. 508 (1905).

[2]) *E. Schulze* und *A. Urich,* Über die Zusammensetzung des Wollfetts. Journ. f. prakt. Chem. [2.] Bd. 7. S. 163 (1873) u. Bd. **9**. S. 321 (1874). — Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **31**. S. 1200 (1898).

[3]) *K. Obermüller,* Beiträge zur Kenntnis der Cholesterine. Inaug.-Dissert. Berlin 1892. S. 35.

Phosphatide.[1]

Von **E. Schulze** und **E. Winterstein**, Zürich.

Als Phosphatide bezeichnen wir stickstoff- und phosphorhaltige Verbindungen, welche den Fetten in manchen physikalischen Eigenschaften und auch in Löslichkeitsverhältnissen nahestehen. Sie unterscheiden sich außer durch den Phosphor- und Stickstoffgehalt von den Fetten dadurch, daß sie mit Wasser kolloidale Lösungen geben, aus denen sie durch Säuren ausgeflockt werden.

Man kann die Phosphatide auf Grund unserer gegenwärtigen Kenntnisse einteilen in Monophosphatide und Diphosphatide etc. Die ersteren enthalten im Molekül 1 Atom Phosphor, die letzteren 2 Atome. Es gibt Phosphatide mit einem Atom Stickstoff im Molekül und solche mit mehreren Atomen. Um diese Unterschiede in der Bezeichnung hervortreten zu lassen, hat man die Ausdrücke Monoaminophosphatide, Diaminophosphatide etc. vorgeschlagen. Doch benutzen wir im folgenden diese Bezeichnung nicht, da wir sie nicht für ganz einwandsfrei halten.

Die Phosphatide sind halbfeste, wachsartige oder feste, spröde, schwach gelblich oder nahezu farblose, sehr hygroskopische Substanzen, denen zuweilen ein eigenartiger Geruch anhaftet. Mit Wasser zusammengebracht quellen sie auf und bilden die sogenannten Myelinformen, mit viel Wasser entstehen kolloidale Lösungen, welche in verdünntem Zustande filtrierbar sind; diese kolloidalen Lösungen gerinnen beim Kochen nicht, sie flocken jedoch bei Anwesenheit von Wasserstoffionen aus.

Das am längsten bekannte Monophosphatid, das Lezithin, ist optisch aktiv, was mit der optischen Aktivität der im Lezithin vorhandenen Glyzerinphosphorsäure zusammenhängt. Über die Größe des Drehungsvermögens lassen sich ganz zutreffende Zahlen nicht angeben, da die Phosphatide beim Erwärmen leicht razemisiert werden. Ferner kann man nicht mit aller Sicherheit behaupten, daß die verwendeten Präparate einheit-

---

[1]) Spezialliteratur: *Thudichum*, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Tübingen 1901. Historische Entwicklung unserer Kenntnisse über die Phosphatide. Inaugural-Dissertation von *O. Hiestand*. Zürich 1906. *A. Erlandsen*, Untersuchungen über die lezithinartigen Substanzen des Myocardiums. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 51. S. 71 (1907). *J. Bang*, Biochemie der Zelllipoide. Ergebnisse der Physiologie. Bd. 6. S. 131 (1907). *S. Fränkel*, Gehirnchemie. Ergebnisse der Physiologie. Bd. 9. S. 212 (1909).

licher Natur waren, auch muß man berücksichtigen, daß die Phosphatide, auch wenn man die Einwirkung höherer Temperaturen ausschließt, bei der Darstellung gewisse Veränderungen erleiden können. Das „Lezithin" ist anisotrop.

Die Phosphatide sind meistens leicht löslich in Äther, Chloroform, Benzol, Tetrachlorkohlenstoff, Dichloräthylen sowie in heißem Alkohol und Essigäther, schwer löslich dagegen in Aceton und Methylacetat. Doch kann die Löslichkeit durch das Vorhandensein anderer Substanzen modifiziert werden.

Die Phosphatide sind leicht veränderliche Substanzen, sie absorbieren leicht Sauerstoff[1]), daher ist bei ihrer Darstellung Luft und Licht tunlichst auszuschließen, auch ist es wünschenswert, bei nicht zu hohen Temperaturen zu arbeiten. Die Phosphatide besitzen ferner die Fähigkeit, sich mit manchen kolloidalen Stoffen zu vereinigen oder solche zu adsorbieren, aber auch mit kristallisierenden Substanzen können sie labile oder auch beständige Verbindungen bilden.

So können die Phosphatide die sonst durch Äther aus alkoholischen Lösungen fällbaren gallensauren Salze zum Teil in Lösung halten und umgekehrt werden sie trotz ihrer Löslichkeit in Alkohol und Äther teilweise zusammen mit den Alkalisalzen der Gallensäuren aus alkoholischer Lösung durch Äther niedergeschlagen. Behandelt man die im Alkohol- und Äthergemisch löslichen Stoffe der Galle mit Wasser, so gehen gleichzeitig mit den gallensauren Salzen auch Phosphatide in das Wasser über.[2])

Durch Alkalien werden die Phosphatide rasch gespalten, organische Säuren scheinen in der Kälte nicht einzuwirken, anorganische Säuren wirken zersetzend aber langsamer als Alkalien. Gewisse Fermente bewirken eine Spaltung.

Manche Phosphatide, so z. B. das eigentliche „Lezithin", werden durch Platinchlorid oder Kadmiumchlorid in alkoholischer Lösung gefällt, doch erfolgt hierbei schon eine teilweise Spaltung bzw. eine Veränderung; in manchen Fällen bewirkt auch eine mit Ammoniak versetzte alkoholische Bleilösung eine Fällung.

Darstellung der Phosphatide.

Die Untersuchungen über tierische und pflanzliche Phosphatide sind zur Zeit nicht soweit vorgeschritten, daß man zur Trennung der einzelnen Glieder dieser Stoffgruppe und zur Beseitigung der Beimengungen Methoden besitzt, die allen Anforderungen genügen und stets befriedigende Resultate liefern. Dieses möge bei der Beurteilung der nachfolgenden Mitteilung Berücksichtigung finden.

---

[1]) *A. Erlandsen*, ibid.; *J. Bang*, ibid.; *W. Heubner*, Betrachtungen über die Zersetzlichkeit des Lezithins. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. **59**. S. 420 (1908).

[2]) *O. Hammarsten*, Zur Chemie der Galle. Ergebnisse der Physiologie. Bd. **4**. S. 14 (1905).

Auch die quantitative Bestimmung der Phosphatide stößt auf große Schwierigkeiten. Im allgemeinen hat man sich darauf beschränkt, den Phosphorgehalt der äther- und alkoholischen Extrakte zu bestimmen und daraus den Phosphatidgehalt zu berechnen. Daß dieses Verfahren Fehler einschließen kann, liegt auf der Hand.

I. Aus Pflanzen.

1. Aus Samen.

Zur Darstellung von Phosphatiden aus Pflanzensamen kann man den bei Behandlung der fein zerriebenen Samen mit Äther verbliebenen Rückstand verwenden, in welchem in der Regel noch ein ansehnlicher Teil der Phosphatide sich vorfindet. Erwärmt man diesen Rückstand mit Alkohol auf 50—60° C, so gehen Phosphatide in Lösung, sie können aus dem Verdampfungsrückstande des weingeistigen Extraktes durch Äther ausgezogen werden. Ihre Isolierung wird in diesem Falle dadurch erleichtert, daß aus dem für ihre Darstellung verwendeten Material die Glyzeride zuvor entweder vollständig oder doch bis auf einen geringen Rest entfernt worden waren; selbstverständlich kann man aber auf solchem Wege nur den bei Behandlung des Samenpulvers mit Äther ungelöst gebliebenen Teil der Phosphatide gewinnen. Hat man es mit fettarmen Samen zu tun, so empfiehlt es sich, dieselben direkt, ohne sie zuvor zu entfetten, mit heißem Alkohol zu behandeln. Der dabei erhaltene Extrakt enthält neben Phosphatiden eine nicht unbeträchtliche Quantität von Glyzeriden, deren Entfernung aber mit Hilfe von Lösungsmitteln, welche diese Stoffe, nicht aber die Phosphatide auflösen, ohne Schwierigkeit gelingt. Es ist zweckmäßig, mit solchen Lösungsmitteln auch die aus zuvor entfetteten Samen dargestellten Phosphatidpräparate zu behandeln. Denn diese Präparate schließen in der Regel kleine Mengen von Glyzeriden ein, da es sehr schwierig ist, die fein zerriebenen Pflanzensamen durch Behandlung mit Äther vollständig von Fett zu befreien. Das zur Isolierung der Phosphatide angewendete Verfahren ist also in der Hauptsache das gleiche, mag man nun die als Material dienenden Samen zuvor entfettet haben oder nicht. Die Ausführung dieses Verfahrens geschieht in folgender Weise:

Man extrahiert die fein zerriebenen Samen oder die bei Behandlung der letzteren mit Äther verbliebenen Rückstände bei 50—60° C mit absolutem oder mit 95%igem Alkohol. Der filtrierte Extrakt wird bei der gleichen Temperatur eingedunstet. Den Verdampfungsrückstand, der stets auch Kohlenhydrate einschließt, behandelt man abwechselnd mit Äther und mit Wasser. Die dabei erhaltenen Lösungen werden, ohne sie stark umzuschütteln, in einen Scheidetrichter gebracht. Die wässerige[1]) Schicht wird, nachdem sie sich geklärt hat, entfernt. Die im Scheidetrichter zurückgebliebene ätherische Lösung, in der die Phosphatide sich vorfinden, schüttelt man zur Reinigung wiederholt mit Wasser. Dabei bilden sich in der Regel Emulsionen, die man beseitigen kann, indem man Kochsalzkristalle in den Scheidetrichter

[1]) Diese Lösung kann eine kleine Menge Phosphatid enthalten.

bringt und dann wieder kräftig schüttelt (statt des Kochsalzes kann man einige andere Salze, z. B. Natriumsulfat, verwenden). Die geklärte, von der wässerigen Schicht getrennte ätherische Lösung wird zur Entfernung des aufgenommenen Wassers mit wasserfreiem Natriumsulfat zusammengebracht, sodann filtriert und der Destillation unterworfen. Den dabei erhaltenen Rückstand behandelt man mit Aceton, welches das Fett löst, von den Phosphatiden dagegen nur einen geringen Teil aufnimmt. Um das Fett noch vollständiger zu entfernen, löst man das Phosphatid in einer nicht zu großen Quantität von Äther und fällt es in dieser Lösung durch Aceton oder durch Methylacetat wieder aus. Diese Operation wird, falls es nötig erscheint, mehrmals wiederholt.

Um die Phosphatide von adsorbierten Substanzen zu befreien, kann man auch in folgender Weise verfahren: Man gießt die konzentrierten alkoholischen Lösungen in möglichst viel destilliertes Wasser, so daß eine stark opalisierende Lösung entsteht, diese Lösung versetzt man mit verdünnter Essigsäure oder besser noch verdünnter Schwefelsäure, bis die Ausflockung beginnt; auch Einleiten von Kohlensäure in die eiskalte Lösung bewirkt ein Ausflocken. Man rührt gut um, dabei ballt sich die Ausscheidung in der Regel zusammen, man dekantiert die Flüssigkeit rasch ab, wäscht mit verdünnter Schwefelsäure durch Dekantation aus, bringt die Masse in einen Scheidetrichter und schüttelt mit soviel Äther durch, daß zwei deutliche Schichten auftreten. Man trennt die ätherische Lösung ab, trocknet sie mit Natriumsulfat. Nach dem Abdestillieren des Äthers verbleiben die Phosphatide als wachsartige Massen zurück, welche man durch Behandeln mit Aceton oder Methylacetat in verschiedene Fraktionen zerlegen kann.

Die so aus Pflanzensamen dargestellten Phosphatide schließen Kohlenhydrate ein, deren Quantität eine sehr wechselnde ist. Man kann manche dieser Phosphatide vielleicht als Verbindungen von „eigentlichem Lezithin" mit Kohlenhydraten ansehen. Solche Phosphatide kann man als Glukophosphatide bezeichnen. Die aus Getreidemehl dargestellten Phosphatide besitzen eine komplizierte Zusammensetzung.

Um über die Beschaffenheit der Phosphatide näheren Aufschluß zu erhalten, untersucht man ihre Spaltungsprodukte.

2. Aus chlorophyllhaltigen Organen.

Es ist bis jetzt noch nicht gelungen, Phosphatide aus Blättern und anderen chlorophyllhaltigen Pflanzenorganen zu isolieren, da man bisher noch keine Methoden kennt, die Phosphatide von den sie begleitenden Farbstoffen zu trennen.

II. Aus tierischen Organen.

Die Gewinnung von Phosphatiden aus tierischen Organen und Flüssigkeiten stößt in vielen Fällen auf Schwierigkeiten, weil die Phosphatide schon beim Trocknen der Organe sowie beim Eindunsten von Flüssig-

keiten auch in neutraler Lösung in ihrer physikalischen und chemischen Beschaffenheit verändert werden können. Es lassen sich daher allgemein gültige Methoden nicht wohl angeben.

Behufs Darstellung der Phosphatide des Eigelbs kann man in folgender Weise verfahren: Das Dotter wird mit Äther wiederholt extrahiert, bis kein Fett mehr in Lösung geht; der hellgelbe Rückstand, welcher neben anderen Bestandteilen das „Lezithalbumin" enthält, wird mit absolutem Alkohol erhitzt, die alkoholischen Extrakte bei möglichst niederer Temperatur, am besten im Vakuum, eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Äther extrahiert und die ätherische Lösung eventuell nach dem bei den Pflanzenphosphatiden angegebenen Verfahren gereinigt.

Nach dem Verfahren von *Bergell*[1]) benutzt man die Fällbarkeit des „Lezithins" durch Kadmiumchlorid. Man verfährt dabei wie folgt: Eigelb wird einige Stunden am Rückflußkühler mit 95%igem Alkohol gekocht, die alkoholische Lösung auf 0° abgekühlt und mit einer alkoholischen Kadmiumchloridlösung gefällt, die dabei entstandene Fällung wird nach einiger Zeit auf einer Nutsche von der Flüssigkeit getrennt, mit 95%igem Alkohol ausgewaschen, sodann im Exsikkator getrocknet, darauf mit Äther entfettet. Nun zersetzt man die Kadmiumdoppelverbindung, indem man sie mit etwa der achtfachen Menge 80%igen Alkohols kocht und sodann allmählich Ammonkarbonat hinzufügt, bis in einer Probe des Filtrats kein Kadmium mehr nachzuweisen ist. Hierzu braucht man nach unserer Erfahrung einen Überschuß von Ammonkarbonat. Die Lösung wird heiß filtriert, auf 10° abgekühlt; der entstandene Niederschlag wird mit Alkohol durch Dekantation ausgewaschen und in Chloroform gelöst. Diese Lösung wird mit Aceton gefällt und der entstandene Niederschlag sofort von der Flüssigkeit getrennt und im Vakuum getrocknet.

Nach den Beobachtungen, die wir bei Untersuchung der Zerealienphosphatide gemacht haben, erhält man dabei Präparate, die zuweilen kleine Mengen Kadmium einschließen.[2])

Da die Phosphatide gegen alkalische Flüssigkeiten sehr unbeständig sind, so ist eine teilweise Veränderung des ursprünglich vorhandenen Phosphatids nicht ausgeschlossen.[3])

Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß die nach den beschriebenen Verfahren dargestellten Präparate nicht einheitlicher Natur sind. Zu besser charakterisierten Verbindungen sind *Erlandsen* sowie *Stern* und *Thierfelder* bei Untersuchung der Phosphatide des Herzmuskels bzw. des Eigelbs gelangt.

---

[1]) *P. Bergell*, Darstellung des Lezithins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **30**. S. 544 (1900).

[2]) *O. Hiestand*, Beiträge zur Kenntnis der pflanzlichen Phosphatide. Dissertation, Zürich 1906. S. 136.

[3]) *A. Erlandsen*, Untersuchungen über die lezithinartigen Substanzen des Myocardiums und der quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **51**. S. 71 (1907).

Die Behauptung *N. A. Barbieris* [1]), daß im Eigelb kein Lezithin, dagegen Ovin sich vorfinde, verdient hier keine Beachtung. *Barbieri* erhielt das Ovin, eine amorphe, weiße Substanz mit einem P-Gehalt von nur 1·35%, aus dem Eigelb in so geringer Menge, daß auf dasselbe nur ein sehr kleiner Bruchteil der Phosphormenge fallen kann, die im Eigelb den äther- und alkohollöslichen Phosphorverbindungen angehört.

Nach *Erlandsen* [2]) verfährt man wie folgt:

Die Herzen werden sorgfältig von Peri- und Endocardium, den Klappen, vom anhaftenden Fett, Sehnen und Gefäßen befreit, sodann mit einer Hackmaschine fein zerkleinert, in dünnen Schichten auf große Glasplatten ausgebreitet, über die geneigt gestellte Platte wird mit einem kräftigen Motor ein Luftstrom geleitet. Das Austrocknen wurde durch Erwärmen des Lokals noch befördert. Nach 12stündigem Trocknen wird die Masse in Gazebeutel gebracht und in einem Vakuumwärmekasten aufgehängt; der Kasten, in welchem Chlorcalcium aufgestellt ist, wird auf 40° erwärmt und ein trockener Luftstrom hindurchgeleitet, nach mehrstündigem Trocknen wird das Material abermals gemahlen und nochmals auf die gleiche Weise getrocknet; die trockene Masse wird in Exsikkatoren aufbewahrt.

Das getrocknete Muskelpulver wird mit Äther in großen Glasgefäßen übergossen, mit Äther einen Tag digeriert, die ätherische Lösung abgetrennt, der Rückstand ausgepreßt und die Extraktion so lange wiederholt, bis nichts mehr in Lösung geht. [3]) Die ätherischen Lösungen werden im Vakuum bei 40° eingedunstet, der Sirup unter Kohlensäure im Dunkeln aufbewahrt.

Der verbliebene Rückstand enthält noch kleine Mengen ätherlöslicher Substanzen, welche erst durch monatelange Behandlung mit Äther entfernt werden können.

Der vollständig mit Äther extrahierte Rückstand wird mit 95%igem Alkohol mehrere Male in der Kälte und dann bei 40—45° extrahiert.

Die alkoholischen Lösungen werden gesondert im Vakuum bei 40° eingedunstet.

Untersuchung der ätherischen Extrakte.

Die mit Hilfe von Äther und Alkohol gewonnenen Substanzen werden in folgender Weise verarbeitet. Der beim Verdunsten des Äthers verbliebene und im Vakuum nicht völlig getrocknete braungelbe, sirupartige Rückstand wird in wenig Äther aufgelöst, von einer kleinen Menge unlöslicher Substanz getrennt, die ätherische Lösung mit Aceton gefällt. Die Fällung wird im Vakuum bei 35—40° unter Durchleiten von Luft vom Aceton befreit;

---

[1]) Compt. rend. de l'Acad. des sciences. Bd. **145**. S. 133 (1907). Mitteilung auf dem Kongreß für angewandte Chemie in London 1909.

[2]) Ibid. S. 136.

[3]) Bei Anwendung von 500 *g* dauert die Extraktion 8—10 Tage.

dann löst man wieder in wasserfreiem Äther, filtriert wieder von dem weißen Rückstand ab. Die ätherische Lösung wird mit ca. 4 Volumina absolutem Alkohol gefällt, nach 12stündigem Stehen in der Kälte bei 0° wird die Fällung mit kaltem absoluten Alkohol gewaschen. Dieser Niederschlag wird abermals in Äther gelöst, mit Alkohol gefällt, dann wird die Fällung mit Alkohol auf 60° erwärmt, wobei sich ein weißlicher Niederschlag auflöst. Es hinterbleiben bräunliche sirupartige Massen; behufs Entfernung der weißen Masse wiederholt man die Operationen der Auflösung in Äther und Fällung mit Alkohol noch einmal. Die nun erhaltene gelbbraune Substanz wird in absolutem Alkohol gelöst und unter CO_2 aufbewahrt, die absolute ätherische, geklärte Lösung bei 0° mit Aceton gefällt, der von der Lösung durch Filtrieren oder Zentrifugieren getrennte Niederschlag wird im Vakuum vom Aceton befreit, sodann im frisch destillierten warmen Essigäther gelöst und bei —2° stehen gelassen, wobei sich ein bräunlicher Sirup ausscheidet. Dieses Umfällen wird eventuell wiederholt, der Rückstand nun bei 40° im Vakuum unter Durchleiten von Luft getrocknet und sodann im Vakuumexsikkator an einem dunklen Ort aufbewahrt. Die so erhaltene Substanz weicht in ihrer Zusammensetzung vom Lezithin ab, sie enthält 1·01% Stickstoff und 4·46% Phosphor. Dieses Phosphatid wird mit dem Namen Cuorin belegt. Das Cuorin enthält auf 1 Atom Stickstoff 2 Atome Phosphor. Das Cuorin, $C_{71}H_{125}NP_2O_{21}$, ist eine gelbbraune, durchsichtige, fast geruchlose, nach dem Trocknen harte, harzartige Substanz; es ist sehr hygroskopisch, leicht löslich in Äther, Chloroform, Petroläther, Schwefelkohlenstoff, unlöslich in kochendem Aceton, Methyl- und Äthylalkohol; mit Wasser bildet es eine Pseudolösung. Das Cuorin absorbiert energisch Sauerstoff aus der Luft, wobei die Jodzahl bedeutend zurückgeht. Mit Platinchlorid und Kadmiumchlorid gibt es Doppelverbindungen. Beim Kochen mit Baryt entstehen ungesättigte Fettsäuren, Glyzerinphosphorsäure und eine Base.

Es erübrigt noch, die Acetonlösung, welche die Fette und eine kleine Menge phosphorhaltiger Substanz enthält, zu besprechen. Diese phosphorhaltige Substanz ist das „eigentliche Lezithin". Die Ätherlösung wird eingedampft, in absolutem Alkohol gelöst und bei 0° abfiltriert. Diese Lösung enthält das Lezithin; die alkoholische Lösung wird mit Platinchlorid gefällt, wobei man eine Fällung erhält, welche die Zusammensetzung $(C_{36}H_{62}NPO_8)_2H_2PtCl_6$ besitzt. Die größere Menge des eigentlichen Lezithins findet sich in der alkoholischen, vom Cuorin getrennten Lösung und wird durch Ausfällen mit Aceton gewonnen.

Untersuchung der alkoholischen Extrakte.

Die vereinigten Alkoholextrakte werden im Vakuum eingedunstet, der Verdampfungsrückstand sodann bei 40° in möglichst wenig absolutem Alkohol gelöst und diese Lösung unter Kohlensäure an einem dunklen Ort aufbewahrt, wobei sich eine alkoholunlösliche Substanz absetzt. Die davon getrennte Lösung wird im Vakuum eingedunstet, der Rückstand mit ab-

solutem Äther übergossen. Nach längerem Stehen in hohen Zylindern wird die gelbe ätherische Lösung vom Ungelösten durch Dekantation getrennt. Diese ätherische Lösung wird im Vakuum eingeengt, sodann wird in der Kälte mit wasserfreiem Aceton gefällt. Der mit Hilfe von Aceton erhaltene Niederschlag wird mit Aceton gewaschen und im Vakuum bei 40° getrocknet. Diese Masse ist bis auf eine kleine Menge löslich in wenig absolutem Alkohol. Die erhaltene Lösung wird so lange mit absolutem Alkohol versetzt, bis keine Fällung mehr auftritt. Die vom Niederschlag getrennte alkoholische Lösung enthielt die Hauptmenge des Phosphatides. Es wird daraus auf Zusatz eines Überschusses von alkoholischer Kadmiumchloridlösung gefällt, 24 Stunden stehen gelassen. Die Fällung wird auf dem Filter mit absolutem Alkohol gewaschen, sodann noch durch Digerieren mit absolutem Alkohol getrocknet und endlich im Exsikkator vom Alkohol befreit. Der gut getrocknete Niederschlag wird im Soxhlet-Apparat längere Zeit mit Äther extrahiert, wobei ein Teil der Phosphatidkadmiumverbindung in Lösung geht. Das Phosphatid kann aus der unlöslichen Verbindung durch Kochen mit Alkohol und Ammonkarbonat, wie oben beschrieben, gewonnen werden: man dunstet das alkoholische Filtrat im Vakuum ein, löst es in Äther, schüttelt im Scheidetrichter mit Wasser, trocknet mit Natriumsulfat und dunstet den Äther ab. Bei diesem Verfahren sollen erhebliche Verluste entstehen. Man kann daher auch in folgender Weise verfahren. Die Fällung wird pulverisiert, im absoluten Alkohol suspendiert und Schwefelwasserstoff unter schwachem Erwärmen eingeleitet. Die warme Lösung wird durch einen Heißwassertrichter filtriert, die Filtrate im Vakuum unter Luftdurchleiten eingedunstet. Die Flüssigkeit wird behufs Entfernung der gebildeten Chlorwasserstoffsäure mit frisch gefälltem Silberoxyd geschüttelt. Die vom Silberchlorid getrennte Flüssigkeit wird wieder mit Schwefelwasserstoff gesättigt, die vom Silbersulfid getrennte Lösung wieder im Vakuum eingedunstet. Bei allen diesen Operationen tritt aber entschieden eine Zersetzung des Phosphatides ein. Das in den Niederschlag eingegangene Phosphatid enthält auf 2 Atome Stickstoff 1 Atom Phosphor. Behufs näherer Charakterisierung der mit Kadmiumchlorid fällbaren Phosphatide spaltet man die mit Alkohol ausgewaschenen Fällungen direkt mit Baryumhydroxydlösung.

Darstellung der Phosphatide aus Eigelb[1]) nach *Stern* und *Thierfelder*.

Frisches Eigelb wird in dünnen Schichten auf Glasplatten ausgebreitet und Luft mit einem Flügelventilator darüber geleitet, darauf wird es zerkleinert und im Vakuumexsikkator getrocknet. Die Trockensubstanz wird mit etwa der doppelten Menge Äther mehrere Stunden geschüttelt, die ätherische Lösung eingedunstet und mit Aceton gefällt; die Fällung wird mit Aceton durchgeknetet. Diese Behandlung des Materials wird einige Male wiederholt.[2]) Da-

[1]) Über die Phosphatide des Eigelbs. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 53. S. 370 (1907).

[2]) Die Filtration nimmt man in einer Kohlensäureatmosphäre vor.

bei gehen in die Acetonätherlösung Phosphatide, die noch nicht untersucht worden sind.

Die mit Aceton erhaltene Fällung wird in Äther gelöst und unter Kohlensäure aufbewahrt. Man trennt die geringe Menge von suspendiertem Eiweiß eventuell durch Dekantieren oder Zentrifugieren; die ganz klare ätherische Lösung wird im Vakuum eingeengt, mit Aceton gefällt, die Fällung mit Aceton durchgeknetet und im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Produkt wird in kleinen verschließbaren Gläschen mit kleinen Mengen Äther behandelt, die trübe Lösung zentrifugiert und auf diese Weise wird die ganze Masse in Lösung gebracht und die sog. „weiße Substanz" abgetrennt. Die ätherische Lösung wird eingedunstet, mit Aceton behandelt, nochmals im Vakuum getrocknet und noch einmal in beschriebener Weise mit Äther behandelt. Auf diese Art wird jedoch die weiße Substanz, welche die Trübung der ätherischen Lösungen bedingt, nicht vollständig entfernt.

Diese ätherische Lösung schließt neben Phosphatiden Cholesterin und natürlich auch Fette ein. Behufs Entfernung dieser Beimengungen wird die ätherische Lösung mit Aceton gefällt, der Niederschlag mit Aceton durchgeknetet, sodann getrocknet, wieder in Äther gelöst und nochmals mit Aceton gefällt; dieses Verfahren wird so lange wiederholt, bis die Äther-Acetonlösung beim Einengen kein Fett, sondern nur Phosphatid ausscheidet. Man erhält so eine hygroskopische, gelbbraune Substanz, welche sich nur zum Teil in Alkohol löst. Sie wird in völlig trockenem Zustande mit viel Alkohol übergossen. Ein Teil bleibt ungelöst als klebrige Masse oder Suspension. Die trübe Lösung wird zentrifugiert und der Bodensatz zum Ungelösten hinzugefügt und dieser unlösliche Anteil in Äther gelöst. Man erhält also eine ätherische und eine alkoholische Lösung.

Die ätherische Lösung wird nach starkem Einengen mit Alkohol gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und dann mit Aceton verrieben. Der im Vakuum getrocknete Rückstand besitzt pulverige Beschaffenheit.

Die von diesem Produkt getrennte ätherische Lösung wurde zentrifugiert, vom Rückstand abgegossen, die Lösung eingeengt, der Rückstand in derselben Weise mit Alkohol und Aceton behandelt und im Vakuum getrocknet. Man erhält somit eine alkoholschwerlösliche Substanz.

Die alkoholische Lösung scheidet nach dem Einengen auf Zusatz von Aceton eine plastische Masse aus, welche nicht krümmelig wird. Um die noch in geringer Menge vorhandenen alkoholschwerlöslichen Beimengungen zu entfernen, wird die Behandlung (Zentrifugieren, Einengen, Fällung mit Aceton) so lange wiederholt, bis die getrocknete Substanz sich in Alkohol löst. Man erhält nun eine alkohol- und ätherlösliche Substanz.

Die äther- und alkohollösliche Substanz, welche noch kleine Beimengungen von der weißen und alkoholschwerlöslichen Substanz, deren völlige Entfernung aber wegen der gegenseitigen Beeinflussung in der Löslichkeit sehr schwierig ist, enthält, ist das eigentliche Lezithin. Es ist eine außerordentlich hygroskopische, nicht pulverisierbare Masse. Die alkoholische Lösung reagiert sauer und wird durch alkoholische Bleiacetatlösung gefällt.

Die alkoholschwerlösliche Substanz wird als ein hellgelbes, lockeres Pulver erhalten. Sie ist auch in warmem Alkohol nur wenig löslich. Das Verhältnis von P zu N ist wie 1:0·77. Die Substanz enthält 1·03% Calcium. Dieses Phosphatid stimmt in manchen Eigenschaften mit dem Kephalin überein.

Die ätherschwerlösliche Substanz. Zu ihrer Gewinnung dient die oben erwähnte „weiße Substanz". Sie wird behufs Entfernung ätherlöslicher Bestandteile in Äther suspendiert und dann zentrifugiert. Dann wird in Alkohol gelöst, wobei kleine Mengen von Vitellin zurückbleiben. Die alkoholische Lösung wird eingeengt und mit Aceton gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit Aceton und Äther gewaschen und getrocknet. Man erhält so eine weiße, leicht pulverisierbare, nicht sehr hygroskopische Masse, welche sich in warmem Alkohol leicht, in Äther hingegen kaum auflöst. Aus der alkoholischen Lösung scheiden sich beim Erkalten allmählich gerade oder gekrümmte, radiär oder rosettenförmig angeordnete Nadeln aus. Die alkoholische Lösung reagiert neutral, sie wird durch Kadmiumchlorid und durch Bleiacetat gefällt. Im Wasser schwillt die Substanz nicht auf. Diese Substanz ist ein Monophosphatid ($C_{54}H_{111}N_2PO_8$) mit 2 Atomen Stickstoff im Molekül.

Aus diesen Untersuchungen von *Stern* und *Thierfelder* ergibt sich also, daß die von früheren Autoren beschriebenen Lecithine ein Gemisch verschiedener Phosphatide waren.

Neuerdings haben sich *S. Fränkel*[1]) und seine Schüler mit den Phosphatiden des Eigelbs beschäftigt. Es gelang ihnen, eine kristallinische Substanz, welche mit dem Namen Neothin bezeichnet wurde, darzustellen.

Die Darstellung geschah in folgender Weise: Trockener Eidotter wurde mit Aceton solange warm extrahiert, als dieser sich noch färbte. Der Rückstand wurde 2 Stunden lang bei 45° mit der doppelten Menge 95%igen Alkohols digeriert, warm filtriert; diese Alkoholextraktion wurde mehrmals wiederholt und die Alkoholextrakte im Vakuum eingedunstet. Aus den ersten Extrakten schied sich beim Einengen im Vakuum ein weißer Niederschlag aus, welcher sich an der Luft nur wenig gelb färbte; dieser weiße Körper wurde aus siedendem Alkohol mehrmals umkristallisiert, bis er blendend weiß war. Der im Vakuum getrocknete Körper besitzt folgende Eigenschaften: Es ist ein blendend weißes Pulver, bei starker Vergrößerung sieht man, daß es aus einem Filzwerk feinster Nadeln besteht. Die Substanz schmilzt bei 91° und zersetzt sich bei 190°; sie ist optisch inaktiv, unlöslich in Wasser, Äther, Petroläther, Aceton und kaltem Alkohol; löslich dagegen in siedendem, absolutem Alkohol, in kaltem Chloroform, Benzol, Toluol und Tetrachlorkohlenstoff. Dem Neothin kommt die Formel $C_{84}H_{172}N_3PO_{15}$ zu.

---

[1]) *S. Fränkel*, Über Lipoide. Biochem. Zeitschr. Bd. 9. S. 44 (1908).

Ausgangsmaterial. Rohphosphatidgemisch

aus Weizenmehl durch Alkoholextraktion gewonnen, wird mit viel Äther in der Wärme behandelt.

- 1. In Äther leicht löslicher Anteil; die ätherische Lösung wird eingedunstet
  - 3. Beim Erkalten kristallinische Ausscheidung (Cholesterin).
  - 4. Mutterlauge von 3 weiter eingedunstet.
    - 5. Kristallinische Ausscheidung.
    - 6. Filtrat von 5 wird durch Destillation vom Äther befreit. Rückstand mit Aceton ausgekocht.
      - 7. Acetonlöslicher Teil.
        - 9. Kristallinische Ausscheidung beim Erkalten.
        - 10. Filtrat von 9.
      - 8. Acetonunlöslicher Teil.
- 2. In Äther schwer löslicher Anteil, wird mit viel absolutem Alkohol erwärmt und gibt:
  - 11. Alkohollöslicher Anteil, mit absolutem Alkohol in der Kälte digeriert liefert zwei Anteile:
    - 15. Alkohollöslicher Anteil: die filtrierte alkoholische Lösung wird in mehrere Liter destilliertes Wasser gegossen, mit verdünnter Schwefelsäure ausgeflockt. Es resultiert eine weiße, gallertartige Fällung und eine schwach gelb gefärbte Lösung:
      - 17. Fällung wird in Äther gelöst.
        - 19. Kristallinische Ausscheidung beim Stehen.
        - 20. Filtrat von 19. die ätherische Lösung wird eingedunstet und der Rückstand mit Aceton gekocht, gibt:
          - 21. Acetonunlöslicher Anteil; dieser wird mit reinem Methylacetat digeriert:
            - 23. Methylacetatunlöslicher Anteil.
            - 24. Methylacetatlöslicher Anteil.
          - 22. Acetonlöslicher Anteil.
      - 18. Lösung mit Baryumhydroxyd neutralisiert, Filtrat eingedunstet, Kohlenhydrate etc.
    - 16. Alkoholunlöslicher Anteil, wird mit Wasser in Lösung gebracht und mit verdünnter Schwefelsäure ausgeflockt.
      - 25. Fällung in Äther und Alkohol gelöst.
        - 27. In Äther-Alkoholgemisch löslicher Anteil. Äther abdestilliert:
          - 29. Kristallinische Ausscheidung.
          - 30. Filtrat von 29.
        - 28. In Äther-Alkoholgemisch unlöslicher Anteil, wird mit Alkohol gekocht:
          - 31. Löslicher Anteil.
          - 32. Unlöslicher Anteil.
      - 26. Wässerige Lösung.
  - 12. In warmem Alkohol unlöslicher Anteil, wird mit absolutem Alkohol gekocht.
    - 13. Löslicher Anteil.
    - 14. Unlöslicher Anteil.

Das Neothin liefert bei der Hydrolyse Fettsäuren und wahrscheinlich auch Cholin, daneben entstehen noch andere Stickstoffverbindungen.

Diese beiden Verfahren können als Schemata für die Trennung und Darstellung der einzelnen Phosphatide dienen: wie man im Einzelfall genau zu verfahren hat, ergibt sich dann aus dem Verhalten des Rohmaterials gegenüber den verschiedenen Lösungsmitteln. Wertvolle Beobachtungen, die aber in mancher Beziehung einer Nachprüfung bedürfen, finden sich in dem Werk von *Thudichum.*[1])

E. Winterstein hat im Verein mit seinen Schülern[2]) schon vor langer Zeit feste, pulverisierbare Phosphatide aus Cerealien dargestellt. Die aus diesen Samen darstellbaren Phosphatide repräsentieren auch ein kompliziertes Gemisch. Das Rohprodukt enthält neben freien Fettsäuren, freiem Cholesterin auch Cholesterinester.

Beistehendes Schema gibt die Art und Weise an, wie *E. Winterstein* und *Smolenski* das Rohpräparat, das aus Weizenmehl[3]) dargestellt worden war, in die verschiedenen Bestandteile zerlegt haben.

Spaltungsprodukte der Phosphatide.

Um nun die verschiedenen Phosphatide näher zu charakterisieren, muß man deren Spaltungsprodukte genau kennen lernen. Das eigentliche Lezithin liefert bekanntlich bei der Spaltung Cholin, Glyzerinphosphorsäure und Fettsäuren, über deren Natur man noch nicht genügend orientiert ist.

Die Spaltung der Phosphatide. Man erhitzt das zu untersuchende Material mit einem Überschuß von Baryumhydroxydlösung am besten in der Weise, daß man die alkoholische oder ätherische Lösung mit der Baryumhydroxydlösung zunächst in der Kälte gut durchschüttelt, dann vorsichtig auf dem Wasserbade unter wiederholtem Schütteln erwärmt, bis das Lösungsmittel entfernt ist. Auf diese Weise erreicht man eine möglichst feine Verteilung des Phosphatids in der Flüssigkeit. Man kocht nun etwa 2 Stunden, filtriert von den ausgeschiedenen Barytseifen ab, leitet in die noch heiße Lösung Kohlensäure ein. Die vom Baryumkarbonat getrennte Flüssigkeit dunstet man zum Sirup ein und extrahiert mit Alkohol das Cholin. (Vgl. beim Cholin.) Der in Alkohol unlösliche Rückstand enthält Glyzerinphosphorsäure. Die Spaltung kann man auch mit einer gesättigten methylalkoholischen Barytlösung vornehmen.[4]) *G. Moruzzi*[5]) spaltet das „Lezithin" mit der 50fachen Menge 10%iger Schwefelsäure, wobei haupt-

[1]) Die Chemie des Gehirns. Tübingen.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **58**. S. 502 (1909).

[3]) Das Weizenmehl wurde in bekannter Weise mit Wasser von der Stärke befreit und der rasch getrocknete Rückstand mit Alkohol extrahiert.

[4]) Weitere Versuche zur quantitativen Gewinnung von Cholin aus Lezithin. *Hugh MacLean,* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **55**. S. 360.

[5]) Versuche zur quantitativen Gewinnung von Cholin aus Lezithin. Ibid. S. 352.

sächlich freie Phosphorsäure entsteht. Um das Cholin zu gewinnen, fällt man mit Phosphorwolframsäure oder Sublimatlösung (siehe beim Cholin).

Winterstein[1 u. 2]) und seine Mitarbeiter spalten die aus Weizenmehl dargestellten Phosphatide durch Erwärmen mit Schwefelsäure, um gleichzeitig die dabei entstehenden Kohlenhydrate zu charakterisieren. Bei Anwendung von Basen als spaltendes Agens werden letztere bekanntlich zersetzt. Um aber genauen Aufschluß über alle Spaltungsprodukte zu erhalten, kann man eine Spaltung mit Alkalien nicht umgehen.

Man verfährt wie folgt: Das Präparat löst man, wenn möglich, in kochendem Alkohol auf, gießt die Lösung in die 20—30fache Menge Wasser, bezogen auf die Menge des zu zersetzenden Präparates. Nun fügt man soviel Schwefelsäure (die man zuvor mit etwas Wasser verdünnt hat) hinzu, bis eine ca. 6—8$^0/_0$ige Lösung resultiert, wobei man tüchtig umschüttelt. Dieses Gemisch wird im Wasserbade unter kräftigem Schütteln mehrere Stunden (5—6) lang erwärmt. Man läßt erkalten, trennt die ausgeschiedenen Fettsäuren ab, schüttelt die saure Lösung mit Äther wiederholt aus und gewinnt auf diese Weise noch kleine Mengen Fettsäuren. Die saure Lösung kann man nun direkt mit Phosphorwolframsäure ausfällen und aus der gut mit 5$^0/_0$iger Schwefelsäure ausgewaschenen Fällung die Basen isolieren. Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag enthält neben Kohlenhydraten noch Stickstoffverbindungen. Man neutralisiert dieses mit Baryumhydroxyd, trennt die Flüssigkeit vom Baryumsulfat und Baryumwolframat ab und dunstet die Lösung zum Sirup ein. Der Sirup wird auf Kohlenhydrate geprüft. Oder man neutralisiert die schwefelsaure Lösung mit Baryumhydroxyd, dunstet zum Sirup ein und extrahiert den Rückstand behufs Gewinnung des Cholins mit Alkohol. In bezug auf die weiteren Details vergleiche man die Arbeit von *E. Winterstein* und *Smolenski.*[3])

ANHANG.

Neben den Phosphatiden findet sich in den Pflanzen eine in Alkohol und Äther unlösliche Substanz, welche bei der Spaltung mit starken Säuren oder Laugen unter Druck Phosphorsäure und Inosit liefert.

Diese Substanz findet sich in den Pflanzensamen als gesättigtes, in Wasser unlösliches Ca-Mg-Salz, einer als „Phytinsäure" bezeichneten Säure.

Das Phytin ist ein saures Ca-Mg-Salz dieser Säure. Die Phytinsäure wird von *Posternak*[4]) als Anhydrodimethylendiphosphorsäure, von

---

[1]) Dissertation. *O. Hiestand.*

[2]) *E. Winterstein* und *O. Hiestand,* Beiträge zur Kenntnis der pflanzlichen Phosphatide. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **54**. S. 288 (1908).

[3]) Ibid. Bd. 58. S. 506 (1909).

[4]) *S. Posternak,* Über die Konstitution der phosphororganischen Reservesäure der grünen Pflanzen und über das erste Reduktionsprodukt der Kohlensäure während der Chlorophyllassimilation. Compt. rend. de l'Acad. des sciences. T. **137**. p. 439 (1903). Ibid. S. 202. Über die Eigenschaften und die chemische Zusammensetzung der phosphororganischen Reservesubstanz der Chlorophyllpflanzen. Ibid. S. 337.

Neuberg[1], *Winterstein*[2]) und anderen Autoren[3]) als eine Inositphosphorsäure angesehen.

Das Phytin ist ein amorphes, weißes, in wenig Wasser (1 : 2·5) lösliches Pulver, die Lösung wird beim Verdünnen infolge Hydrolyse trüb. In Mineral- und Essigsäure ist es leicht löslich. Die essigsauren Lösungen koagulieren beim Erhitzen.

Darstellung des Phytins. Es wird aus den Samen nach einer Reihe von Patenten durch Extraktion mit verdünnten Säuren und Wiederausfällen durch Neutralisation mit alkalischen Erden gewonnen. Handelt es sich um die Darstellung der freien Säure, so fällt man aus einer mit der berechneten Menge Natriumacetat versetzten salzsauren Lösung mit Kupferacetat das Kupferphytin aus und zersetzt dieses Salz mit Schwefelwasserstoff.

---

[1]) *C. Neuberg*, Zur Frage der Konstitution des „Phytins". Biochem. Zeitschr. Bd. 9. S. 557 (1908).

[2]) *E. Winterstein*, Ein Beitrag zur Frage der Konstitution des Phytins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58. S. 118 (1908).

[3]) *U. Suzuki*, *K. Joshimura* und *M. Takaishi*, Über ein Enzym, Phytase, das Anhydrodimethylendiphosphorsäure spaltet. Bull. of the College of Agricult. Tokio. Imp. University. Bd. 7. S. 503 (1907).

Eiweißstoffe.

A. Darstellung der Proteine der Pflanzenwelt.

Von **Thomas B. Osborne,** New-Haven, Connecticut, U. S. A.

Einleitung.

Außer den Proteinen der Pflanzenwelt sind mit Ausnahme der in den Samen vorkommenden nur wenige untersucht worden. Da der Verfasser keine eigene Erfahrung in der Darstellung von Proteinen anderer Pflanzenteile besitzt, so ist die Beschreibung der hier gegebenen Methoden notwendigerweise auf die Darstellung von Samenproteinen beschränkt. Die Samenproteine können in die folgenden Gruppen eingeteilt werden.

I. Einteilung der Samenproteine.

1. Globuline.

Weitaus der größte Teil der Samenproteine zeigt die Löslichkeitsverhältnisse, die gewöhnlich als charakteristisch für die Globuline gelten, d. h. sie sind unlöslich in Wasser, aber löslich in neutralen Salzlösungen.

Diese Samenglobuline stimmen, was ihre Fällungsverhältnisse durch Ammonsulfat betrifft, mit der gebräuchlichen Definition eines Globulins nicht überein, denn während einige schon bei halber oder noch weniger starker Sättigung mit diesem Salz ausfallen, werden andere nicht gefällt bis ihre Lösung beinahe vollständig gesättigt ist.

Bei der Darstellung von Samenglobulinen muß berücksichtigt werden, daß viele nur dann die charakteristische Löslichkeit der Globuline zeigen, wenn sie mit einer sehr geringen Menge Säure zu Proteinsalzen verbunden sind. Wenn diese Säure durch Neutralisation ganz entfernt wird, ist das Protein vollständig löslich in Wasser. In den folgenden Seiten werden solche Proteinsalze als Globuline behandelt werden, denn die bei der Extraktion der Samen erhaltenen Proteine werden fast immer als Proteinsalze isoliert.

2. Prolamine.

Verfasser schlägt vor, mit diesem Namen jene wohl charakterisierte Gruppe von Proteinen zu bezeichnen, die durch Extraktion der Samen der Zerealien mit Alkohol von 50—80 Volumprozenten erhalten werden.

Dieser Name zeigt an, daß diese Proteine verhältnismäßig große Quantitäten von Prolin und Amidstickstoff liefern, wenn sie mit Säuren zersetzt werden. In den Samen von allen bis jetzt untersuchten Zerealien, Reis ausgenommen, wird verhältnismäßig viel Prolamin gefunden. Die Prolamine sind nicht bloß durch ihre Löslichkeitsverhältnisse und ihre physikalischen Eigenschaften charakterisiert, sondern auch durch ihre Abbauprodukte, da sie alle sehr wenig Arginin und Histidin, viel Prolin, Ammoniak, Glutaminsäure und kein Lysin liefern.

3. Gluteline.

Diese Proteine sind unlöslich in allen neutralen Lösungsmitteln und können aus den Samen nur mit verdünnten Alkalien oder Säuren extrahiert werden.

Das Glutenin oder Glutenkasein des Weizens ist das beste Beispiel dieser Gruppe. Andere ähnliche Proteine existieren wahrscheinlich auch in den Samen anderer Zerealien, aber von ihnen ist wenig bekannt infolge der großen Schwierigkeit, sie in annähernd reinem Zustande zu isolieren.

In anderen Samen als den der Zerealien bleibt auch nach wiederholter Extraktion mit den verschiedenen neutralen Lösungsmitteln Stickstoff im unlöslichen Rückstande des Mehles zurück. Ein Teil dieses Stickstoffes gehört zweifellos zu den Proteinen, welche in den unverletzten Zellen zurückgeblieben und daher den neutralen Lösungsmitteln nicht zugänglich sind. Ein anderer Teil dieses Stickstoffes jedoch kann mit verdünnten alkalischen Lösungen extrahiert werden und gehört wahrscheinlich bis zu einem gewissen Grade Verbindungen der löslichen Proteine mit anderen Bestandteilen des Samens, z. B. mit Nukleinsäure, an. Es ist noch unsicher, ob etwas von diesem Stickstoff zu Proteinen gehört, welche einen anderen Charakter besitzen als die durch die neutralen Lösungsmittel extrahierten Eiweißstoffe, oder ob zu Proteinen, die ähnliche Eigenschaften, wie die Zerealiengluteline besitzen, denn die durch Alkali extrahierten und durch Neutralisation gefällten Produkte sind zu unrein, um bestimmte, sie betreffende Schlüsse zu rechtfertigen.

4. Albumine.

Fast alle Samen enthalten 0·1—0·5% wasserlösliche, durch Hitze koagulierbare Proteine, welche die wesentlichen Eigenschaften der animalischen Albumine besitzen. Viele von diesen Samenalbuminen werden aus ihren Lösungen vor Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt.

5. Proteosen.

Beinahe alle Samen, die mit Wasser oder Salzlösung extrahiert werden, liefern eine kleine Quantität von Proteinen mit Eigenschaften, die gewöhnlich als charakteristisch für die durch Einwirkung von Fermenten auf tierische Proteine entstehenden Proteosen betrachtet werden. Proteosen, die

in den Eigenschaften mit den Proto-, Deutero- und Heteroproteosen übereinstimmen, sind in kleinen Quantitäten aus Samen erhalten worden. Es ist nicht sicher, ob diese Proteosen ursprüngliche Bestandteile des Samens sind, oder ob sie durch enzymatische Wirkung während der Extraktion entstehen.[1] Die Gesamtquantität von den aus den Samen erhältlichen Proteosen übersteigt selten einige Hundertstel von einem Prozent. Diese Gattung von Proteinen, falls sie wirklich ursprüngliche Bestandteile des Samens sind, kommt wahrscheinlich hauptsächlich im Embryo vor, da verhältnismäßig große Quantitäten aus dem Weizenembryo erhalten worden sind.[2])

Da diese Proteosen in sehr kleinen Mengen vorkommen und ihr Ursprung unsicher ist, und da sie ferner in verschiedenen Formen existieren, ist kein Versuch gemacht worden, besondere Methoden zu ihrer Darstellung auszuarbeiten. Zu ihrer Isolierung werden die gleichen Methoden angewandt, die zur Darstellung und Trennung der tierischen Proteosen dienen.

II. Chemischer Charakter der Proteinpräparate.

Es ist wichtig, so genau als möglich von einem chemischen Standpunkt aus den Charakter der hier beschriebenen Präparate von Proteinen zu bestimmen. Da keine physikalischen Eigenschaften existieren, durch welche die chemische Individualität einer Proteingattung festgestellt werden kann, ist es unmöglich zu entscheiden, ob die hier beschriebenen Präparate einheitliche chemische Individuen oder Gemische von zwei oder mehr einander ähnlichen Proteinen sind.

Die Proteine sind amphotere Substanzen und sind, wenn sie nicht aus chemisch neutralen Lösungen isoliert werden, je nach den Fällungsverhältnissen mit geringen Quantitäten von Basen oder Säuren verbunden. Es ist praktisch unmöglich, die Bedingungen bei der Darstellung der meisten Proteine so zu wählen, daß die Bildung solcher Proteinverbindungen[3]) vermieden wird, und da die Samenproteine aus schwach sauren Extrakten dargestellt werden, so sind die zu beschreibenden Proteine zweifellos Mischungen von Proteinsalzen derjenigen Säuren, die in der Lösung, aus der die Proteine zuletzt erhalten wurden, zugegen waren.

Eine weitere Schwierigkeit bietet der Umstand, daß die einzelnen Proteine bei der Darstellung Veränderungen erleiden können, die ihre Eigenschaften, z. B. ihre Löslichkeit, beeinflussen. So kann in manchen Fällen ein Teil des Proteinniederschlages im ursprünglichen Lösungsmittel ungelöst bleiben.

---

[1]) cf. *Vines*, The Proteases of Plants. IV. Annals of Botany. XX. p. 113 (1906) und Proteases of plants. IV. Ibid. XXII. pag. 103 (1906). — *Dean*, On Proteolytic Enzymes. I. Botanical Gazette. XXXIX. p. 321 (1908).

[2]) cf. *Osborne* and *Campbell*, The Nucleic Acid of the Embryo of wheat and its Protein Compounds. Journ. of the Amer. Chemical Society. XXII. p. 379 (1900).

[3]) cf. *Osborne*, Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säuren und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXIII. S. 240 (1901).

Diese Umwandlung, welche zur Bildung unlöslicher Produkte führt, die als Proteane bezeichnet werden mögen, scheint in den meisten Fällen durch die hydrolytische Wirkung[1]) der vorhandenen Säuren veranlaßt zu sein und kann gewöhnlich zum großen Teil vermieden werden, wenn die Menge freier Säure im Extrakt sehr gering ist. Es ist jedoch in vielen Fällen schwierig oder unmöglich, die Gegenwart einer kleinen Menge dieser unlöslichen Produkte in den Proteinpräparaten auszuschließen.

Die Möglichkeit von Umwandlungen, welche die Proteine durch die Samenfermente erleiden können, verdient ebenfalls Beachtung. Das Vorkommen proteolytischer Fermente in vielen Samen ist wohl bekannt und es ist wahrscheinlich, daß in vielen Fällen die Isolierung der Proteine hierdurch beeinträchtigt wird.[2]) Solche Umwandlungen beeinflussen wahrscheinlich eher die Ausbeute der zu beschreibenden Proteine als ihren Charakter, denn alle bekannten Produkte der primären Einwirkung proteolytischer Enzyme sind viel löslicher in Wasser als die hier beschriebenen Präparate.

Diese Präparate stellen Produkte dar, die, wie durch sukzessive fraktionierte Fällung erwiesen wurde, konstante Zusammensetzung und einheitliche physikalische Eigenschaften besitzen. Soweit letztere mit den zur Verfügung stehenden Mitteln bestimmt werden konnten, ist bis jetzt kein Anzeichen vorhanden, daß die Präparate Mischungen zweier oder mehrerer Proteine sind. Daß sie bestimmte chemische Substanzen im Sinne des organischen Chemikers sind, ist wohl kaum anzunehmen. Man kann vorläufig nur sagen, daß die meisten von ihnen wohldefinierte, individuelle Proteine mit ganz bestimmten Eigenschaften darstellen, und daß man dieselben Eiweißstoffe mit den gleichen Methoden immer wieder erhält.

III. Allgemeine Methoden zur Darstellung von Samenproteinen.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß durch andere als die hier beschriebenen Methoden in vielen Fällen ebenso gute oder bessere Resultate erhalten werden können, aber in Übereinstimmung mit dem Zwecke dieses Werkes werden nur diejenigen Methoden angegeben, die sich in der bisherigen Praxis als befriedigend erwiesen haben. Es ist z. B. wahrscheinlich, daß in vielen Fällen Zentrifugieren vorteilhaft an Stelle der Filtration angewendet werden kann, besonders wenn man mit kleinen Mengen arbeitet, aber da der Verfasser diese Methode wegen der Schwierigkeit, eine passend große Zentrifuge zu erhalten, nie angewandt hat, ist sie in den folgenden Seiten nicht angeführt. Da bei der Darstellung verschiedener Proteine die-

[1]) *Osborne*, Ein hydrolytisches Derivat des Globulins Edestin und sein Verhältnis zu *Weyls* Albuminate und zur Histongruppe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXIII. S. 225 (1901). — Derselbe, A Hydrolytic Derivative of the Globulin Edestin and its relations to *Weyl's* Albuminate and the Histon Group. Journ. Amer. Chemical Society. XXIV. p. 28 (1902).

[2]) *Vines*, The Proteoses of Plants. IV. Annals of Botany. Vol. XX. p. 113 (1906) und The Proteoses of Plants. V. Ibid. XXII. p. 103 (1908).

selben Operationen wiederholt angewendet werden, ist in diesem Abschnitt die detaillierte Beschreibung der gemeinsamen Operationen angegeben und darauf bei der Beschreibung der Darstellung der einzelnen Proteine durch Zahlenhinweis Bezug genommen.

A. Das Mahlen der Samen.

Um Samen zur Extraktion zuzubereiten, ist es nicht bloß wichtig, sie fein zu mahlen, sondern auch ihre Schalen und Samenhäute zu entfernen. Diese enthalten nämlich gewöhnlich Farbstoffe und häufig Tannin, Phytin etc. — Stoffe, die in der Folge die Proteinpräparate verunreinigen würden.

1. Ölarme Samen.

Die äußere Hülle dieser Samen wird durch einen allmählichen Zerkleinerungs- und Siebeprozeß entfernt — im wesentlichen das vom Müller

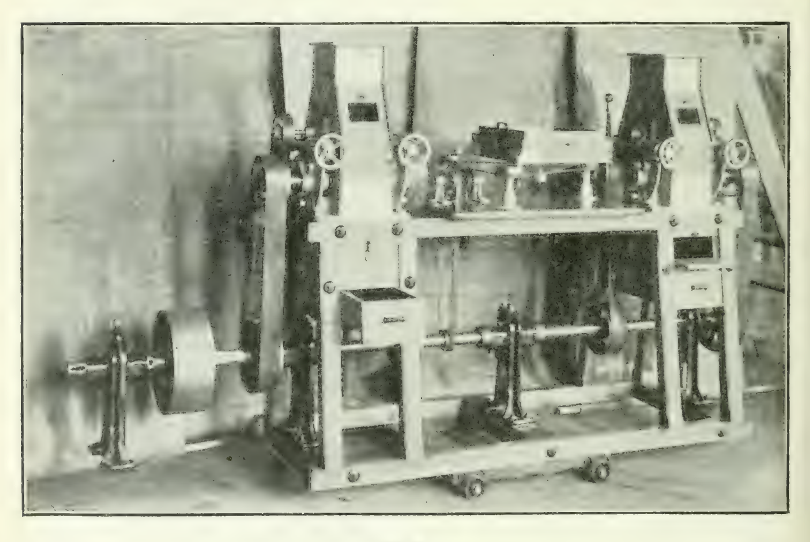


Fig. 30.

bei der Darstellung des Weizenmehles angewandte Verfahren. Zu diesem Zwecke eignet sich die „Experimental Reduction Mill" (Fig. 30), welche von The Allis-Chalmers Co. of Milwaukee, Wisconsin, U. S. A. hergestellt wird. Diese Mühle, welche zum Mahlen kleiner Quantitäten von Weizen zu Versuchszwecken bestimmt ist, eignet sich auch zum Mahlen vieler anderer Samensorten. Sie enthält ein Paar auf einander passende, mit

Rinnen versehene Walzen, die verschieden rasch laufen. Durch diese werden die Samen zuerst grob gemahlen, so, daß die Samenhäute meist in großen Stücken entfernt werden. Ein Paar glatte Walzen zerkleinern das teilweise gemahlene Endosperm zu einem Pulver, während die Samenhäute durchgehen, ohne zermalen zu werden. Mittelst einer mechanisch arbeitenden Siebvorrichtung, in die Siebe verschiedener Weite eingesetzt werden können, kann der größere Teil der Samenhäute während des Mahlprozesses entfernt werden. Durch allmähliches Zerkleinern und Sieben der Samen und Wiedermahlen der gröberen Partikel wird ein feines, von Samenhäuten fast freies Mehl erhalten.

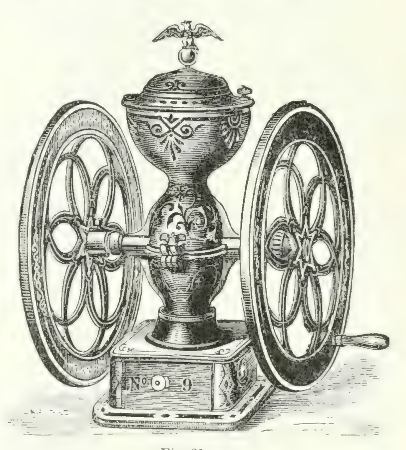


Fig. 31.

Dasselbe Resultat kann mit anderen Mühlen, wiewohl weniger erfolgreich, erzielt werden, wenn man die gröberen und härteren Teile der Samenhüllen absiebt und die gröberen Teile des Endosperms zu einem feinen Pulver zermahlt.

Eine sehr gute und billige, für allgemeine Zwecke brauchbare Mühle wird von der Enterprise Manufacturing Co. of Philadelphia, Pennsylvania, U. S. A., als Kaffeemühle hergestellt (Fig. 31). Diese Mühle ist in verschiedenen Größen für Hand- und Kraftbetrieb zu haben. Die in Fig. 32 abgebildete Mühle ist für das Mahlen vieler Samen ebenfalls brauchbar.

2. Ölreiche Samen.

a) Kleine Samen. Samen, die viel Öl enthalten, bilden beim Zermahlen eine Paste, welche die Mühle verstopft. Sie können nicht in der „Experimental Reduction Mill" gemahlen werden. Sie lassen sich aber leicht in den in Fig. 32 und 33 dargestellten Mühlen mahlen, wenn man die Samen mit ungefähr einem Drittel ihres Volumens Kerosinöl mischt, bevor man sie in die Mühle bringt. Das beim Mahlen sich bildende Gemisch ist eine dünne Paste und geht so durch die Mühle, ohne sie zu verstopfen. Nach grobem Zermahlen kann die Masse mit Petroläther extrahiert oder noch besser mit einer hydraulischen Presse ausgepreßt werden. Der mehlige Rückstand wird dann gesiebt, um die größeren Teile der äußeren Samenhäute zu entfernen. Diese werden noch einmal gemahlen und, wenn nötig, noch einmal gesiebt.

b) Große Samen. Große Samen, wie Nüsse, können nach Entfernen der Schalen am besten in einer Fruchtpresse zerkleinert werden.

Diese Presse (Fig. 33) besteht aus einem verzinnten Eisenkonus von zirka 25 *cm* Länge, in welchem eine konische Schraube den Samen vom Trichter am weiteren Ende des Konus durch eine regulierbare Öffnung an dessen schmäleres Ende treibt. Längs der Unterseite des Konus, der eine horizontale Lage hat, befindet sich eine Serie von Löchern, durch welche der größere Teil des Öles ausfließt, während die zerdrückten Samen durch die Öffnung am schmäleren Ende gepreßt werden. So zerdrückt und größtenteils vom Öl befreit, kann der Rest des Öls mit Petroläther leicht so weit entfernt werden, daß die Samen nachher zu einem feinen Pulver gemahlen werden können.

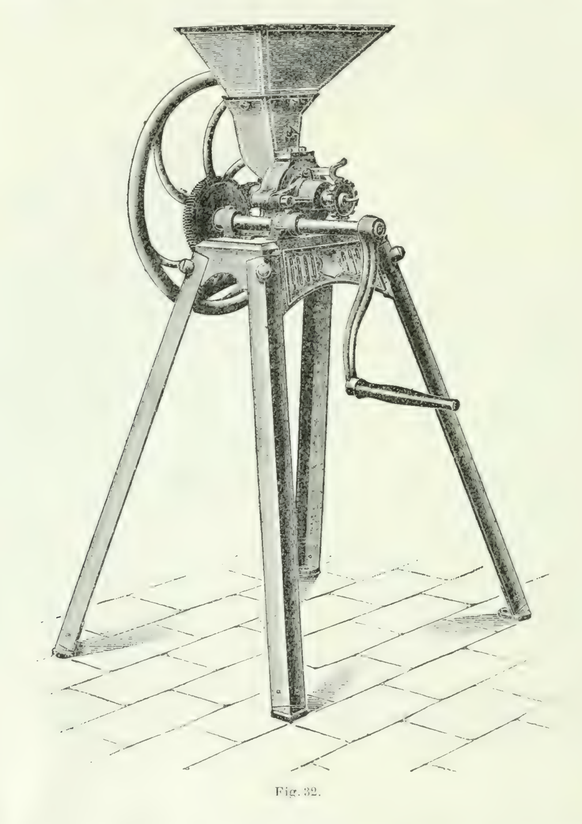


Fig. 32.

B. Extraktion des Mehles.

Während des Extraktionsprozesses und bei allen zur Isolierung und Reinigung der Proteine erforderlichen Operationen ist es absolut nötig, die Lösung vor der Entwicklung von Organismen zu schützen. Dies kann durch eine reichliche Anwendung von Toluol, das häufig erneuert und mit der Lösung gut gemischt werden muß, erreicht werden. In der folgenden Beschreibung der verschiedenen Prozesse bei der Darstellung von Proteinpräparaten ist vorausgesetzt, daß Toluol in dieser Weise zugefügt wurde. Dies wird weiterhin nicht mehr erwähnt werden.

1. Menge des Lösungsmittels.

Die Menge des erforderlichen Lösungsmittels muß so groß sein, daß mindestens drei Viertel des verwendeten Quantums in filtrierbarer Form vorliegt. Die Menge hängt demnach von der absorbierenden Kraft des Mehles ab. Die geeignete Quantität wird darum in den Darstellungsmethoden der einzelnen Proteine angegeben werden.

Die beschriebenen Methoden sind zur Darstellung relativ großer Proteinmengen berechnet. Die Menge des Lösungsmittels ist der Bequemlichkeit halber so klein als möglich gewählt. Wenn kleinere Mengen von Mehl möglichst vollständig extrahiert werden sollen, so ist eine entsprechend große Menge des Lösungsmittels erforderlich.

2. Dauer der Extraktion.

Fein zerteilte Samenproteine lösen sich sehr schnell auf, wenn sie mit dem geeigneten Lösungsmittel digeriert werden. Es ist deshalb nicht ratsam, die Extraktion über die Zeit hinaus auszudehnen, welche nötig ist, um alle Partikel des fein zermahlenen Materials mit dem Lösungsmittel in unmittelbare Berührung zu bringen. Es genügt kurz dauerndes, aber tüchtiges Durchrühren.

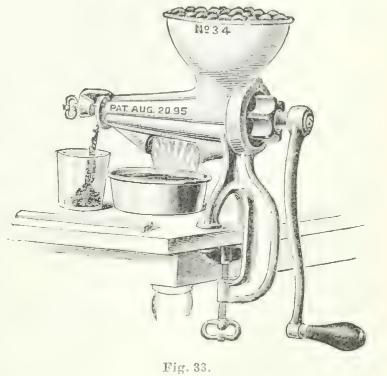


Fig. 33.

Da die Samenextrakte beim Stehen gewöhnlich, wenn nicht immer, saurer werden und da die Samenfermente wahrscheinlich Umwandlungen in den Proteinen verursachen, ist es wichtig, mit wässerigen Lösungsmitteln die Extraktion so schnell, wie möglich, durchzuführen und lieber auf die Vollständigkeit der Extraktion zu verzichten, als Veränderungen oder Verluste des Proteins zu riskieren.

Die Trennung des Extraktes vom ungelösten Material wird daher sofort nach dem Mischen mit dem Lösungsmittel vorgenommen; denn die Zeit, die zu dieser Trennung und dem nachfolgenden Waschen des unlöslichen Rückstandes nötig ist, genügt vollständig, um eine praktisch vollständige Lösung alles löslichen Proteins zu erzielen.

C. Filtration des Extraktes.

Erfolgreiche Filtration des Extraktes und der Lösungen der Proteine ist von grundlegender Bedeutung bei der Darstellung von Proteinpräparaten. Richtige Präparate können nicht erhalten werden, wenn ihre Lösungen nicht gänzlich frei von unlöslichen Substanzen sind. Zur Erreichung dieser Resultate sind daher die folgenden Methoden ausführlich angegeben.

1. Leicht filtrierbare Extrakte.

Die Mischung von Mehl und Lösungsmittel wird sofort auf ein genügend feinmaschiges Tuch geworfen, um den größeren Teil des unlöslichen Rückstandes zurückzuhalten. Wenn der größte Teil des Lösungsmittels durchgelaufen ist, wird der Rückstand in einer starken Presse ausgedrückt. Dieser Rückstand kann nicht ausgepreßt werden, wenn er zu viel Lösungsmittel enthält. Dieses muß daher größtenteils entfernt werden, bevor man versuchen darf, den Rückstand unter die Presse zu bringen. Es ist Erfahrung nötig, um den richtigen Moment festzustellen.

Die *Buchner*sche hydraulische Presse (Fig. 34) ist zum Auspressen von Samenrückständen gut geeignet, doch kann auch eine starke Schraubenhandpresse vorteilhaft angewandt werden. Der Preßrückstand muß dann noch einmal durch eine Wiederholung des vorigen Prozesses gewaschen und das Extrakt sofort durch eine dicke Schicht von Papierbrei auf einem *Büchner*schen Porzellantrichter filtriert werden.

Diese Schicht von Papierbrei kann leicht hergestellt werden, indem man in einem großen Gefäß Filtrierpapierstücke und destilliertes Wasser mischt und das nasse Papier mit der Hand zu einem feinen Brei zerteilt. Man muß so viel Papier anwenden, daß man nachher eine halbfeste Masse bekommt.

Um mit diesem Brei ein Filter zu machen, wird so viel in einen Büchnertrichter gefüllt, daß er ohne Anwendung der Saugpumpe bis oben gefüllt ist. Der Trichter wird dann mit einer guten Saugvorrichtung verbunden. Während des Saugens wird der Brei mit der Hand gut zusammengepreßt, bis daraus durch die Saug- und Druckwirkung nur noch wenig Wasser entfernt wird. Es ist vorteilhaft, wenn die Oberfläche des Filters leicht konkav ist, so daß es an den Seitenwänden des Trichters etwas dicker ist, denn während der Filtration verursacht der unlösliche Rückstand einen vermehrten Druck auf das Filter, welcher ein allmähliches Schrumpfen der Filterschicht an den Rändern des Trichters bewirkt. Während der Filtration muß der Filterrand deshalb sorgfältig niedergepreßt

werden. Die Filterschicht muß vor der Filtration vollständig mit dem zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel ausgewaschen werden.

Mit einer guten Saugpumpe können die meisten Samenextrakte auf diese Weise verhältnismäßig rasch und sehr vollständig filtriert werden. Wenn die Filtration infolge Verstopfung des Filters langsam wird, kann die Oberfläche mit einem passenden Instrument aufgekratzt und die Fil-

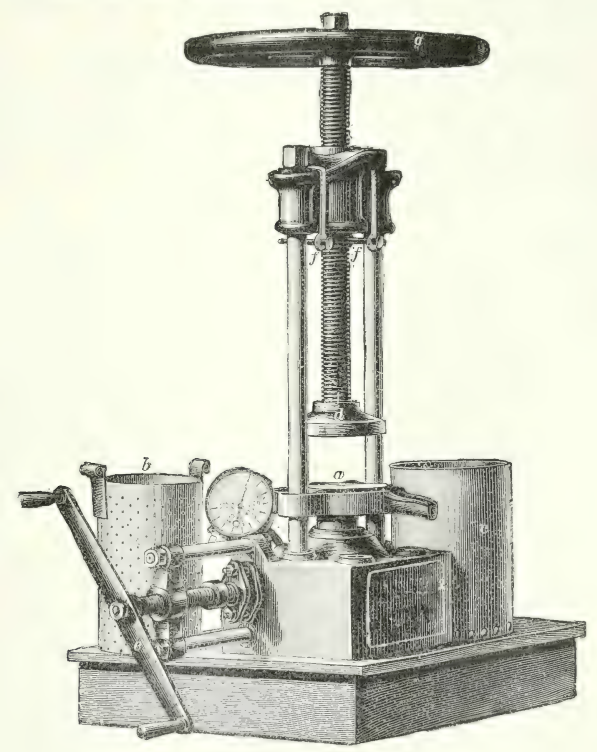


Fig. 34

tration beschleunigt werden. Wenn nach einiger Zeit die Filtration auch durch Aufkratzen nicht mehr beschleunigt werden kann, wird das Filter entfernt, in einer frischen Menge des Lösungsmittels gewaschen und in einer hydraulischen oder Handpresse ausgepreßt. Der Rest des Extraktes und die Waschwässer müssen dann durch ein neues Filter filtriert werden.

Diese Filtrationsmethode der Proteinlösungen hat sich als sehr empfehlenswert erwiesen. Wenn richtig gehandhabt, können verhältnismäßig

große Flüssigkeitsmengen schnell filtriert und viel klarer erhalten werden, als auf irgend einem anderen bis jetzt versuchten Wege. Diese Filtrationsmethode empfiehlt sich nicht, um große Quantitäten unlöslicher Stoffe zu entfernen; besser wird die Hauptmenge derselben durch Absetzen und Durchgießen durch ein Tuch weggeschafft. Die so erhaltene Lösung ist dann für die oben beschriebene Filtration geeignet. Ein wenig Erfahrung mit dieser Methode wird dem Experimentator bald zeigen, wann und wie er sie anwenden soll.

2. Extrakte von an Stärke reichen Samen.

Extrakte von stärkereichen Samen können nach dem Seihen durch ein Tuch nicht filtriert werden, bis der größere Teil der Stärke sich gesetzt hat, denn die Stärkekörner sind so klein, daß ein großer Teil derselben durch das Koliertuch geht.

3. Gummistoffe enthaltende Extrakte.

Samenextrakte, die viel Gummistoffe oder sonst das Filter leicht verstopfende Stoffe enthalten, werden am besten so behandelt, daß man zum Extrakt eine große Menge in kleine Stücke zerrissenes Filtrierpapier gibt und das Papier mit einem Glasstab oder mit der Hand zu einem Brei zerkleinert.

Die angewandte Papiermenge sollte genügend sein, um alle Flüssigkeit zu absorbieren und eine halbfeste Masse zu bilden, die dann in ein Tuch gebracht und mit einer starken Hand- oder hydraulischen Presse ausgedrückt wird. Bei großem Druck ist der Verlust gering, und das Extrakt wird gewöhnlich so frei von unlöslichen Bestandteilen erhalten, daß es schnell vollständig klar durch eine Schicht von Papierbrei filtriert werden kann.

D. Fällung.

1. Durch Neutralisation.

Fast alle Samenproteine werden aus alkalischer oder saurer Lösung gefällt, wenn ihre Reaktion schwach sauer gemacht wird. Der Niederschlag besteht aus einem Proteinsalz der Säure. Der Betrag dieser gebundenen Säure ist sehr klein. Beim Neutralisieren solcher Lösungen darf Phenolphtalein nicht angewandt werden, denn dieser Indikator zeigt einen Überschuß von Säure erst dann an, wenn die mit dem Protein verbundene Säure vollständig neutralisiert ist. Lackmus ist der beste Indikator für diese Fällungsmethode der Sameneiweißkörper, denn die Fällung aus saurer Lösung beginnt gewöhnlich, wenn die Reaktion gegen Lackmus schwach sauer wird. Auch die Fällung aus alkalischer Lösung ist vollständig, wenn dieser Säuregrad erreicht ist.

2. Durch Dialyse.

Die Dialyse großer Flüssigkeitsmengen wird leicht durch eine Methode erzielt, welche seit mehreren Jahren im Laboratorium von Pro-

fessor *R. H. Chittenden* gebraucht wird. Man stellt einen Dialysierbeutel her, indem man ein genügend großes Stück gänzlich durchfeuchteten Pergamentpapiers über den Boden einer Schüssel breitet und die zu dialysierende Lösung auf das Papier gießt. Die Papierränder werden dann um ein Stück Glasrohr von ca. 10 *cm* Länge und 1 *cm* Weite vereinigt und daran befestigt, indem man eine starke Schnur mehrmals außen um das Papier herumwickelt. Auf diese Weise wird ein Dialysierbeutel hergestellt, wie er in Fig. 35 dargestellt ist.

Dieser Beutel muß so groß sein, daß noch genügend Raum über der Oberfläche der eingeschlossenen Flüssigkeit bleibt, um das durch die Dialyse vermehrte Volumen zu halten. Das Glasrohr (1) an der Mündung des Beutels bietet ein Mittel, um von Zeit zu Zeit Toluol hinzuzufügen oder Proben der Lösung oder des Niederschlages herauszunehmen. Der Dialysierbeutel muß in einem Trog aufgehängt werden, durch den man vom Rohr (2) her einen langsamen Wasserstrom fließen läßt. Diese Gestalt des Dialysators ist besonders für große Flüssigkeitsmengen passend. Ein Stück Pergamentpapier 70 × 100 *cm* bildet einen Beutel von 3—4 *l* Inhalt. Ein Extrakt, das mit 10⁰/₀iger Kochsalzlösung erhalten wurde, wird in diesem Dialysator chlorfrei, wenn es ungefähr 5 Tage in einem langsamen Wasserstrom gehalten wurde.

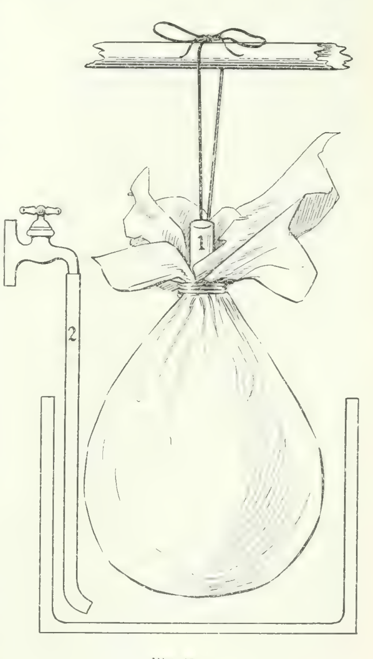


Fig. 35.

3. Durch Alkohol.

Fällung mittelst Alkohols kann häufig angewendet werden, um Samenproteine aus ihren wässerigen Lösungen zu trennen. Wenn das Flüssigkeitsvolumen groß ist, wird die Fällung am besten bewerkstelligt, indem man die wässerige Lösung in einem Pergamentbeutel in ungefähr demselben Volumen Alkohol suspendiert. Da das Wasser rasch in den Alkohol diffundiert, wird die Proteinlösung konzentriert und die zur vollständigen Fällung des Proteins nötige Menge Alkohol ist auf diese Weise verhältnismäßig klein.

4. Durch Neutralsalze.

Ammoniumsulfat ist das einzige Salz von praktischer Bedeutung, das zur Fällung von Samenproteinen angewendet worden ist. Es wird vorteilhaft verwendet, um kleine Quantitäten von Proteinen von großen Flüssigkeitsvolumina zu trennen, so daß sie wieder in einem kleineren Flüssigkeitsvolumen aufgelöst werden können.

Mittelst fraktionierter Fällung durch Ammonsulfat können auch viele Proteine schnell und leicht von einander getrennt werden. Die Erfahrung hat bei den Samenproteinen gezeigt, daß die Fällungsgrenzen, die *Hofmeister* und seine Schüler als charakteristisch für jedes Protein betrachteten, nicht so exakt sind, wie allgemein geglaubt worden ist.[1] Die Grenzen, zwischen denen die Fällung erfolgt, sind in weiten Grenzen abhängig von der Behandlung, der das Protein vorher unterworfen worden ist. So wurde gefunden, daß der innerhalb bestimmter Grenzen im Samenextrakt gebildete Niederschlag innerhalb weiterer Grenzen und bei niedrigerer Sulfatkonzentration gefällt wurde, wenn er vorher gelöst und durch Dialyse wiedergefällt worden war. Gleichwohl ist diese Methode sehr erfolgreich bei der Trennung vieler Proteine.

Das jeweilige Verfahren wird für jeden einzelnen Fall in der detaillierten Beschreibung der Fällungsmethode angegeben werden.

Um die Erzeugung einer Lösung von gegebener Ammonsulfatkonzentration aus einem gegebenen Volumen von bekannter niedrigerer Konzentration zu erleichtern, sei folgende Tabelle angegeben.

Tabelle mit der in Grammen angegebenen Ammonsulfatmenge, welche zu jedem Liter einer Lösung von der angegebenen Konzentration zugefügt werden muß, um eine Lösung von bestimmter, höherer Konzentration zu erzielen:

Ursprüngliche Sättigung	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10
0·0	76·0	152·0	228·0	304·0	380·0	456·0	532·0	608·0	684·0	760·0
0·1	—	73·5	146·9	220·4	293·8	367·3	440·8	514·2	587·7	661·1
0·2	—	—	70·4	140·7	211·1	281·5	351·9	422·2	492·6	563·0
0·3	—	—	—	67·9	135·7	203·6	271·4	339·3	407·1	475·0
0·4	—	—	—	—	65·5	131·0	196·5	262·0	327·5	393·0
0·5	—	—	—	—	—	63·3	126·7	189·0	253·3	316·7
0·6	—	—	—	—	—	—	61·3	122·6	183·9	245·2
0·7	—	—	—	—	—	—	—	59·4	118·7	178·1
0·8	—	—	—	—	—	—	—	—	57·6	115·2
0·9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	55·9

Beim Gebrauch dieser Tabelle ist es notwendig, den durch das gelöste Protein ausgeübten Einfluß auf das Volumen der Lösung zu vernachlässigen. Er kommt nur für konzentrierte Lösungen in Betracht. Die Anwendung dieser Tabelle sei an folgendem Beispiel erklärt:

---

[1] *Osborne* und *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903). — Ferner *Osborne* und *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Proteins, Second Paper. Amer. Journ. of Physiol. XIII. p. 436 (1905).

Ein Extrakt wird dargestellt, indem man 1 *kg* Samenmehl mit 3 *l* einer Lösung behandelt, die $^2/_{10}$ der zur völligen Sättigung nötigen Ammonsulfatmenge, d. h. 152 *g* des Salzes in 1 *l* Wasser, enthält. Von diesem Extrakt werden nach der Filtration 2 *l* erhalten, die auf $^4/_{10}$-Sättigung gebracht werden müssen. 1 *l* der $^2/_{10}$ gesättigten Lösung braucht nach der Tabelle 140·7 *g* Sulfat, um sie $^4/_{10}$ gesättigt zu machen, daher brauchen die beiden Liter des Extraktes 281·4 *g*. Diese Methode, die Sulfatkonzentrationen herzustellen, ist verschieden von *Hofmeisters* Methode, bei der die Konzentrationen durch die Anzahl Kubikzentimeter gesättigter Lösung in einem Volumen von 10 cm^3 angegeben wird.

Durch *Hofmeisters* Methode wird eine $^5/_{10}$ gesättigte Lösung hergestellt mit 5 cm^3 der Proteinlösung und 5 cm^3 der gesättigten Sulfatlösung. Dies gibt jedoch keine Lösung, die wirklich $^5/_{10}$ gesättigt ist, wie durch das folgende Beispiel gezeigt wird.

100 cm^3 gesättigter Sulfatlösung enthalten 71·5 cm^3 Wasser, 5 cm^3 enthalten 3·57 cm^3, die mit 5 cm^3 der Proteinlösung 8·57 cm^3 ausmachen. Da 1 cm^3 Wasser 0·38 *g* Sulfat löst, müssen 8·57 cm^3 3·26 *g* gelöst enthalten, um $^5/_{10}$ gesättigt zu sein. Da man 5 cm^3 gesättigter Lösung zugegeben hat, sind bloß 2·7 *g* zugefügt worden, infolgedessen enthält die Lösung nur 41% der zur völligen Sättigung notwendigen Menge. Es ist daher wichtig, sich diese Tatsachen bei den nachfolgenden Beschreibungen der Methoden zu merken; in diesen ist der Grad der Sättigung stets auf wirkliche Sättigung bezogen.

E. Lösen von Niederschlägen.

1. Lösen von Niederschlägen im allgemeinen.

Die meisten Proteinniederschläge lösen sich sehr rasch auf, wenn sie in fein verteiltem Zustande mit dem geeigneten Lösungsmittel zusammengebracht werden, dagegen ergeben sich Schwierigkeiten, wenn sich bei der Darstellung der Proteine Klumpen bilden. Ihre Lösung wird daher sehr erleichtert, wenn man das Gemisch in Wasser suspendiert und durch ein feines Siebtuch gehen läßt. Die ungelösten Klumpen werden hierbei auf dem Tuch zurückgehalten und können leicht durch eine steife Borstenbürste zerkleinert werden. Wenn der Niederschlag in Wasser löslich ist, oder wenn er durch Ammonsulfat erhalten worden ist und in der durch Behandlung mit Wasser entstehenden verdünnten Salzlösung gelöst wird, so wird er auf diese Weise rasch in Lösung gebracht werden können.

2. Lösung von Globulinniederschlägen.

Niederschläge von Globulinen, die in Wasser unlöslich sind, müssen immer auf obige Weise behandelt werden, um eine fein zerteilte wässerige Suspension zu erhalten. Das zur Lösung dienende Salz darf erst zugefügt werden, nachdem sämtliches Globulin durch das Tuch gegangen ist, denn wird das Salz vor dem Sieben durch das Tuch zugefügt, so werden stets Klumpen gebildet, die sich nachher nur sehr langsam wieder lösen.

3. Lösen großer Ammonsulfatniederschläge.

Große Niederschläge, die durch Sättigung mit Ammonsulfat erhalten werden und die von der anhaftenden Sulfatlösung nicht befreit werden können, ohne daß viel Zeit und absorbierendes Filtrierpapier angewandt wird, können am besten gelöst werden, wenn man sie, während sie noch viel anhaftende Flüssigkeit enthalten, von den Faltenfiltern trennt und genügend Wasser zufügt, um eine dünne Paste zu erzeugen und die Masse während ungefähr 24 Stunden dialysiert. Auf diese Weise wird genug Ammonsulfat entfernt, um den Niederschlag in einem viel kleineren Volumen löslich zu machen, als nötig wäre, wenn so lange Wasser zugefügt würde, bis die Konzentration der anhaftenden Sulfatlösung derart vermindert ist, daß eine Lösung des Niederschlages möglich wird.

F. Waschen von Niederschlägen.

Da es gewöhnlich schwierig ist, Niederschläge von irgendwie beträchtlichen Mengen Protein auf den Filtern derart zu waschen, daß die anhaftende Mutterlauge rasch entfernt wird, müssen die Niederschläge vom Papier entfernt und in fein verteiltem Zustande in der zum Waschen bestimmten Flüssigkeit suspendiert werden. Dies wird bewerkstelligt, indem man die Suspension durch feines Siebtuch gießt. Zur Beschleunigung des Prozesses benutzt man eine flache Borstenbürste.

Globulinniederschläge, die durch fraktionierte Fällung aus Salzlösungen erhalten worden sind, werden zuerst mit einer Salzlösung von der Konzentration des Filtrates gewaschen, denn wenn Wasser angewendet wird, so kann Protein aus der Mutterlauge gefällt werden. Nachdem man das ursprüngliche Filtrat völlig ausgewaschen hat, wird die Salzlösung mit Wasser entfernt.

Einige Globulinniederschläge enthalten Verbindungen des Proteins mit kleinen Quantitäten von Säure, welche löslich in reinem Wasser, aber unlöslich in verdünnten Salzlösungen sind. Wenn man diese Niederschläge mit Wasser auswäscht, wird ein Teil des Niederschlages gelöst, wodurch nicht bloß Verluste verursacht werden, sondern auch gewöhnlich Verstopfung der Filter erfolgt, auch wird darauffolgendes Waschen unmöglich gemacht. In solchen Fällen wird mit verdünnter Salzlösung gewaschen. Der Niederschlag wird nachher bis zur Entfernung des Salzes mit verdünntem Alkohol, dann mit stärkerem Alkohol und zuletzt mit absolutem Alkohol und Äther behandelt.

G. Trocknen von Niederschlägen.

Präparate, die vollständig mit absolutem Alkohol ausgewaschen worden sind, werden leicht von der noch anhaftenden Feuchtigkeit so weit befreit, daß sie in ein feines Pulver übergeführt werden können. Wenn jedoch die Behandlung mit absolutem Alkohol nicht genügend gewesen war, werden die Präparate zäh und hart. Hierdurch wird die spätere Entfernung aller anhaftenden Flüssigkeit und die Pulverisierung erschwert.

Vorläufiges Trocknen wird erzielt, wenn man das Präparat entweder in einem Exsikkator oder bei mäßiger Temperatur in einem Strom von trockener Luft in einer dünnen Schicht auf dem Boden einer flachen Schüssel oder auf einer Schicht Filtrierpapier ausbreitet. Beim Trocknen großer Quantitäten von Niederschlägen müssen die größeren Klumpen zerkleinert werden, sobald sie leicht zerdrückt werden können, so daß Feuchtigkeit, die nicht völlig entfernt worden ist, durch die ganze Masse verteilt wird. Dies verhindert, daß ein Teil des Präparates in zähe und hornige Klumpen verwandelt wird.

So getrocknet, bis der Alkohol größtenteils entfernt ist, sind die Präparate in geeignetem Zustand, um zu fernerem Gebrauch aufbewahrt zu werden. Die meisten Präparate halten in diesem Zustand 8—10% Feuchtigkeit und Alkohol zurück. Vollständiges Trocknen erfordert mehrstündiges Erhitzen auf ca. 110°.

Infolge der hygroskopischen Natur von völlig trockenen Proteinen müssen Präparate für Analysenzwecke wenigstens 6—8 auf einander folgende Stunden im Trockenschrank gehalten werden. Die Vollständigkeit der Trocknung muß durch ein zweites, gleich langes Erhitzen kontrolliert werden. Wenn die zweite Periode des Trocknens von zu kurzer Dauer ist, nehmen die Präparate gewöhnlich an Gewicht zu, indem sie während des Erwärmens im Trockenschrank Feuchtigkeit aufnehmen. Sie halten diese so zähe zurück, daß mehrstündiges Erhitzen nötig ist, um sie wieder völlig auszutreiben.

H. Prüfung der Reinheit der Präparate.

Farbstoffe, die häufig vorhanden sind, brauchen nicht besonders nachgewiesen zu werden, da sie dem Auge leicht sichtbar sind. Die Verunreinigungen, nach denen hauptsächlich in den Präparaten von Samenproteinen gesucht werden muß, sind: Säuren verschiedener Art, mineralische Bestandteile, Öle und andere ätherlösliche Bestandteile und Kohlehydrate. Diese Verunreinigungen können durch folgende Methoden nachgewiesen werden.

1. Gebundene Säuren.

Die zur Bildung von Proteinsalzen nötige Menge Säure ist sehr klein, denn gewöhnlich braucht es wenig mehr als 1 cm^3 und selten mehr als 2 cm^3 $^1/_{10}$ normales Alkali, um 1 *g* des Präparates gegenüber Phenolphtalein zu neutralisieren. Die Menge der gebundenen Säuren kann bestimmt werden, indem man 1 *g* des Präparates in ca. 10 cm^3 neutraler Kochsalzlösung auflöst, etwas Phenolphtalein zufügt und mit $^1/_{10}$ normaler Kali- oder Natronlauge titriert. Die Endreaktion ist gewöhnlich scharf.

Wenn man die Reinheit der Proteinpräparate prüft, so ist die Tatsache, daß Proteinsalze vorliegen, von großer Wichtigkeit, denn der hauptsächlichste Zweck bei der Darstellung ist die Gewinnung von Produkten, die eine einzige Proteinsubstanz enthalten, nicht die Gewinnung einer einzigen bestimmten Verbindung dieses Proteins. Bei unseren gegenwärtigen Kenntnissen kann das letztere gewöhnlich nicht erreicht werden.

Geringfügige Unterschiede im Gehalt an gebundener Säure können große Unterschiede in der Löslichkeit des Proteins verursachen und leicht zum Glauben führen, daß ein Präparat, das in Wirklichkeit nur ein einziges Protein enthält, ein Gemisch von zwei ganz verschiedenen Proteinen darstellt. So können aus Hanfsamen Präparate von Edestin erhalten werden, die in Wasser völlig unlöslich sind, während andere darin teilweise oder sogar größtenteils löslich sind. Diese Verschiedenheit rührt von der Gegenwart eines etwas größeren Gehaltes an gebundener Säure in dem Teil, der in Wasser löslich ist, her, denn wenn dieser gegen Phenolphtalein neutralisiert wird, wird das Produkt völlig unlöslich in Wasser.

Die Tatsache, daß Proteinpräparate, wie sie gewöhnlich erhalten werden, fast immer Mischungen von solchen Proteinsalzen darstellen, verdient besondere Beachtung in Beziehung auf die Gegenwart des Phosphors, denn ein Phosphorgehalt schließt nicht notwendigerweise in sich, daß das fragliche Protein als Nukleoprotein oder Phosphorprotein betrachtet werden muß.

In den Samenextrakten ist gewöhnlich eine nicht unbeträchtliche Menge von Phosphorsäure und zweifellos an organische Säuren gebundener Phosphor vorhanden. Diese phosphorhaltigen Säuren können sich teilweise oder vollständig mit dem Protein zu einem Proteinsalz vereinigen. Dieser gebundene Phosphor verschwindet aus den Präparaten nach einer genügenden Anzahl von Fällungen und ist in solchen, wie den studierten Fällen, kein integrierender Bestandteil des Proteinmoleküls.

So enthalten Edestinpräparate, die durch direkte Dialyse des Hanfsamenextraktes erhalten werden, stets einen kleinen Betrag von Phosphor. In Wasser suspendiert und gegen Phenolphtalein neutralisiert, bleibt das Edestin ungelöst. Wenn das Edestin abfiltriert und die Lösung zur Trockne verdampft wird, enthält der Rückstand sämtliches zur Neutralisation erforderlich gewesene Alkali als eine Mischung von Alkalisalzen der Säuren, die vorher mit dem Edestin verbunden gewesen waren. Unter diesen ist Alkaliphosphat, was beweist, daß der im rohen Edestin enthaltene Phosphor hauptsächlich aus einer Phosphor enthaltenden Säure besteht. Wenn das rohe Edestin durch Dialyse wiedergefällt wird, so verschwindet der Phosphor größtenteils oder vollständig. Dies trifft auch für die meisten anderen Samenproteine zu, deren Darstellung in den folgenden Seiten beschrieben ist.

Aus Pflanzengeweben, die, wie der Weizenembryo, reich an kernhaltigen Zellen sind, wird mit den Proteinen eine große Quantität von Nukleinsäure extrahiert, und es ist in solchen Fällen schwierig, phosphorfreie Präparate zu erhalten. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß selbst in diesen Fällen der größte Teil dieses Phosphors in der Nukleinsäure enthalten ist, die mit dem Protein einfach als Salz verbunden ist, denn bei fraktionierter Fällung schwankt der Gehalt an Phosphor in den einzelnen Fraktionen sehr weit, und es können Fraktionen erhalten werden, die überhaupt keinen Phosphor enthalten.[1])

[1]) *Osborne* and *Campbell,* The Nucleic Acid of the Wheat Embryo and its Protein Compounds. Journ. Amer. Chemical Society. XXII. p. 379 (1900).

Rohe Proteinpräparate aus Leguminosensamen enthalten gewöhnlich eine nicht unbeträchtliche Quantität von Phosphor, was zu dem weitverbreiteten Glauben geführt hat, daß diese Proteine Phosphor in ihren Molekülen enthalten. Wenn jedoch diese Präparate sorgfältig durch auf einander folgende Fällungen gereinigt werden, werden sie phosphorfrei erhalten, ohne daß sie eine merkliche Veränderung in ihren Eigenschaften oder ihrer Zusammensetzung zeigen. Der Phosphorgehalt muß daher als Verunreinigung betrachtet werden.

2. *Anorganische Verunreinigungen.*

Aus Samen dargestellte Proteine enthalten gewöhnlich eine geringere Menge anorganischer Verunreinigungen als die aus den tierischen Geweben dargestellten Proteine. Neben der eben erwähnten geringen Menge anorganischer Säuren weisen die meisten Präparate von Samenproteinen eine geringe Menge anorganischer Stoffe auf, die als Asche erscheinen, wenn die Präparate verbrannt werden. Präparate, die 2- oder 3mal aus verhältnismäßig verdünnten Lösungen wiedergefällt worden sind, enthalten gewöhnlich 0·2—0·4% Asche und bei denjenigen, die noch sorgfältiger gereinigt worden sind, sinkt der Aschegehalt sogar auf noch weniger als 0·1%, so daß solche Verunreinigungen in gut gereinigten Präparaten wenig Berücksichtigung erfordern.

3. *Ätherlösliche Verunreinigungen.*

Die meisten der Proteine, deren Darstellung in den folgenden Seiten beschrieben wird, werden gewöhnlich frei von ätherlöslichen Beimengungen erhalten, wenn ihre Lösungen vor der endgültigen Fällung sorgfältig vollständig klar filtriert werden. Die Präparate müssen jedoch immer mit trockenem Äther gewaschen werden. Die Abwesenheit von ätherlöslichen Verunreinigungen wird durch Verdunstung eines Teiles der letzten Ätherwaschungen festgestellt.

4. *Prüfung auf Kohlehydrate.*

Gut gereinigte Präparate einer großen Zahl der aus Pflanzen dargestellten Proteine geben keine Reaktion mit α-Naphtol und Schwefelsäure (Molischreaktion). Diese Reaktion wird mit allen Kohlehydraten erhalten und kann daher verwendet werden, um die Gegenwart von Kohlehydraten in den Präparaten mancher in den folgenden Seiten beschriebener Proteine nachzuweisen. Dieser Nachweis ist jedoch so empfindlich, daß große Sorgfalt angewendet werden muß, um Präparate zu erhalten, welche diese Reaktion nicht geben, denn selbst eine geringe Quantität von Filtrierpapierfasern, die dem Präparat beigemengt sind, wird eine positive Reaktion bedingen. Die Abwesenheit dieser Reaktion zeigt nicht bloß das völlige Fehlen von beigemengten freien Kohlehydraten an, sondern auch die Abwesenheit von Nukleinsäuren, Glukosiden und anderer kohlehydratgebender Substanzen.

Eine Anzahl der in den folgenden Seiten beschriebenen Präparate gibt *Molisch'* Reaktion in geringem Grade, was zweifellos von einer Spur kohlehydratgebender Substanz herrührt, die schwieriger zu entfernen ist, als das mit den die Reaktion nicht gebenden Präparaten vorkommende Kohlehydrat. Eine Anzahl anderer Proteine geben eine starke Reaktion mit dem Molischreagens. Vielleicht liegt hier eine Kohlehydratkomponente des Eiweißes selbst vor.

Bei Anwendung der *Molisch'* Reaktion muß deren große Empfindlichkeit in Betracht gezogen werden, da eine ganz unbedeutende Menge von Kohlehydrat eine sehr starke Reaktion gibt. So genügen z. B. $^2/_{10}$ *mg* Filtrierpapier, $^1/_{10}$ *mg* Arabinose oder Dextrin und $^5/_{10}$ *mg* Nukleinsäure, um unter den folgenden, für die Prüfung der Proteine geeigneten Bedingungen starke Reaktionen zu erhalten.

Ungefähr 50 *mg* des Proteins werden in 1 *cm*³ Wasser suspendiert, 3—5 Tropfen einer 15%igen alkoholischen α-Naphtollösung zugefügt und dann die Proteinlösung allmählich und vollständig mit 3 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure gemischt. Wenn Kohlehydrate vorhanden sind, so entwickelt sich bald nach der Zufügung der Schwefelsäure eine tiefe Purpurfärbung, deren Intensität bei der Zugabe von mehr Säure zunimmt. Die Färbung wird durch zuviel Säure zuletzt zerstört, so daß Sorge getragen werden muß, daß die Säure allmählich und unter fortwährendem Schütteln zugefügt und die Maximalintensität der Färbung beobachtet wird.

Wenn in den Präparaten, die nach obigen Angaben *Molisch'* Reaktion nicht geben, die völlige Abwesenheit jeder Kohlehydratspur bewiesen werden soll, muß die Probe mit einer größeren Menge des Präparates wiederholt werden.

Ritthausens Reaktion kann ebenfalls zur Prüfung auf Kohlehydrate verwendet werden, aber das Resultat ist ungewiß, denn in denjenigen Präparaten, die, wie Ovalbumin, Glukosamin enthalten, läßt sich die Kohlehydratgruppe auf diesem Wege nicht nachweisen. Ungefähr $^5/_{10}$ *g* des Proteins werden in 5 *cm*³ Wasser suspendiert, dann wird 5 *cm*³ konzentrierte Schwefelsäure zugefügt und die Lösung 5—10 Minuten gekocht. Sodann wird mit 30—40 *cm*³ Wasser verdünnt und einige Stunden stehen gelassen. Wenn die verdünnte Lösung nur wenig gefärbt ist und klar bleibt, so darf die Abwesenheit von Stärke, Gummi etc. angenommen werden. Wenn sich ein flockiger, dunkler Niederschlag absetzt, so ist die Gegenwart dieser Kohlehydrate wahrscheinlich. Es muß jedoch daran erinnert werden, daß alle Proteine, wenn sie lange mit siedender Schwefelsäure hydrolysiert werden, unlösliche Produkte von ähnlichem Aussehen liefern, und es ist nicht ausgeschlossen, daß derartige Produkte auch unter den oben beschriebenen Umständen entstehen. Wenn das Präparat Fett enthält, so wird die verdünnte Lösung trüb, und es muß Sorge getragen werden, diese Trübung von dem durch die Kohlehydrate verursachten flockigen, dunkelgefärbten Niederschlag zu unterscheiden.

Die Tatsache, daß viele Samenproteine aus kohlehydratreichen Geweben absolut frei von diesen Substanzen erhalten werden können, ist ein starker Beweis, daß die Proteinpräparate, was adsorbierte Verunreinigungen betrifft, in höherem Reinheitsgrad dargestellt werden können, als von vielen auf diesem Felde arbeitenden Forschern angenommen wird.

IV. Spezielle Methoden zur Darstellung der einzelnen Proteine.

I. Globuline.

1. Edestin aus Hanfsamen (Cannabis sativa).

Der Name Edestin ist für mehrere anscheinend ähnliche Proteine verschiedener Samenspezies angewandt worden, ist hier aber zur Bezeichnung des hauptsächlichsten Proteins des Hanfsamens gebraucht, da deutliche Unterschiede zwischen diesem Protein und denen anderer Samen existieren. Neben Edestin, das verhältnismäßig leicht kristallisiert erhalten wird, kann durch Extraktion mit neutralen Salzlösungen nur ein sehr geringes Quantum anderer Proteinsubstanzen gewonnen werden. Diese bestehen aus Proteosen und aus Spuren eines Proteins, das beim Erhitzen des Kochsalzextraktes auf ca. 86° koaguliert und das durch Sättigung mit Natriumchlorid gefällt wird.[1])

a) Darstellung von Edestin.

Die Hanfsamen werden, wie unter I. 2*a* beschrieben, in einer Mühle unter Beifügung von Kerosin gemahlen. Die gemahlene Masse wird dann mit Petroläther extrahiert oder durch Druck vom größten Teil des Öles und Kerosins befreit. Die Hüllen werden durch Sieben entfernt. 100 *g* des feinen Mehles werden dann mit ca. 300 *cm*³ 10%iger mit Phenolphtalein versetzter Kochsalzlösung behandelt und kalt gesättigte Barytlösung allmählich zugefügt, bis das Extrakt nach tüchtigem Durchrühren eine blaßrote Färbung zeigt. Die hierzu erforderliche Menge Barytlösung wird notiert.

1 *kg* desselben Hanfsamenmehls wird dann mit 2 *l* 10%iger Natriumchloridlösung behandelt. Hierzu fügt man nach tüchtigem Durchrühren eine Mischung von 800 *cm*³ 10%iger Kochsalzlösung und einer Menge von Barytlösung, welche ungefähr 50% weniger beträgt, als die Menge, welche nötig ist, um die saure Reaktion des Samenextraktes gegen Phenolphtalein zu neutralisieren (gewöhnlich ungefähr 200 *cm*³). Das Ganze wird dann nochmals tüchtig durchgerührt und auf 3 bis 4 Faltenfilter (*Schleicher & Schüll*, Nr. 580, 38 *cm*) gegossen, nachdem diese vorher mit 10%iger Kochsalzlösung befeuchtet worden sind. Nach 3 Stunden hat man ungefähr 1500 *cm*³ eines leicht getrübten Filtrates erhalten, das gegen genau neutrales Lackmuspapier gerade merklich sauer reagiert. Der Rückstand wird zusammen mit dem Filtrierpapier in ein Becherglas geworfen und mit so viel zerrissenem,

[1]) *Osborne*, Crystallized Vegetable Proteins. American Chemical Journ. XIV. p. 663. (1892).

weichem Filtrierpapier gemengt, daß alle Flüssigkeit absorbiert und eine halbfeste Masse gebildet wird. Diese wird einem hohen Druck — am besten in einer hydraulischen Presse — ausgesetzt und so ca. 1500 *cm*³ eines sehr trüben Preßsaftes erhalten.

Während dieser Rückstand ausgepreßt wird, wird das zuerst erhaltene Filtrat auf einem 20 *cm* Büchnertrichter durch eine dicke Schicht von Papierbrei, wie unter C. 1 beschrieben, filtriert. Wenn dieses Filtrat vollständig durch die Papierschicht durchgegangen ist, wird der trübe Preßsaft auf derselben Schicht filtriert und eine etwas opaleszente, im durchfallenden Licht aber klare Lösung erhalten. Die Zeit, die nötig ist, um den Prozeß auf diesen Punkt zu bringen, beträgt ungefähr 6 Stunden.

Die Lösung wird dann, wie unter D. 2 angegeben, 4 Tage lang in einem Strom fließenden Wassers dialysiert, während welcher Zeit sich das Edestin in kristallinischem Zustande abscheidet. Der Inhalt des Dialysators wird dann in einem großen Gefäß absetzen gelassen. Nach 3—4 Stunden wird die überstehende, fast völlig klare Flüssigkeit abgehebert. Diese enthält zu wenig suspendiertes Edestin, um eine Filtration zu lohnen und wird, da durch weitere Dialyse kein Edestin mehr erhalten werden kann, weggeworfen.

Das abgesetzte Edestin wird dann in einem *Büchner*schen Trichter auf einem Stück gehärteten Filtrierpapier gesammelt, mit der Pumpe trocken gesogen und mit Wasser gewaschen. Dieses rohe Edestin wiegt, nachdem es mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet worden ist, ungefähr 125 *g* und ist, mit Ausnahme einer unbedeutenden Menge, in 10%iger Natriumchloridlösung völlig löslich.

Das Edestin kann von dem in eben beschriebener Weise dargestellten Extrakt auch so getrennt werden, daß der klar filtrierte Auszug mit so viel destilliertem, auf 70° erhitztem Wasser verdünnt wird, daß dessen Natriumchloridkonzentration auf 3% reduziert ist. Nachdem die Lösung im Zimmer allmählich erkaltet ist, wird sie an einem kalten Ort 12 bis 20 Stunden lang aufbewahrt und auf ungefähr 5° gekühlt. Die Ausbeute nach dieser Fällungsmethode beträgt ungefähr 100 *g* rohes Edestin aus einem Kilo ölfreiem Mehl.

Wenn das rohe Edestin gereinigt werden soll, wird es noch feucht, nach E. 2, in 10%iger Natriumchloridlösung gelöst. Für 125 *g* Edestin soll das Endvolumen nicht geringer als 1500 *cm*³ sein. Diese Lösung wird, nachdem sie durch eine dichte Schicht von Papierbrei, nach C. 1, filtriert worden ist, nochmals 4 oder 5 Tage dialysiert und der Niederschlag, wie oben beschrieben, gewaschen und getrocknet.

Das Edestin kann auch in folgender Weise aus warmer, verdünnter Salzlösung umkristallisiert werden. Es wird so viel 10%ige Natriumchloridlösung zugefügt, bis eine ca. 8%ige Edestinlösung erhalten wird, E. 2. Stärker konzentrierte Lösungen geben in der Regel bei der nachfolgenden Behandlung keine wohlcharakterisierten Kristalle. Die Lösung wird filtriert, auf 50° erwärmt und dann allmählich mit 2 Volumen Wasser von der-

selben Temperatur verdünnt. Beim Kühlen der vollständig klaren Lösung auf ungefähr 5° scheidet sich das Edestin in schön kristallisiertem Zustande ab.

Beim Wiederholen dieses Prozesses wird ein sehr reines Produkt erhalten. Dieses wäscht man nach F. mit ungefähr 0·5%iger Natriumchloridlösung, sodann mit 50%igem Alkohol bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, nachher mit stärkerem Alkohol und zuletzt einige Male mit absolutem Alkohol und mit Äther. Das Produkt wird im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Das Edestin wird in oben erwähnter Weise mit 0·5%iger Natriumchloridlösung gewaschen, weil ein Teil des Präparates in Wasser löslich, in verdünnter Salzlösung aber unlöslich ist. Dieser Teil enthält mehr Säure als der unlösliche Teil[1]) und entspricht augenscheinlich einer höheren Säureverbindung als der letztere. Um die kristallinische Struktur des ganzen Präparates zu erhalten, wird eine verdünnte Salzlösung zum Auswaschen benutzt, die nachher durch verdünnten Alkohol entfernt wird. Wenn ein von gebundener Säure freies Edestin gewünscht wird, muß die letzte Kristallisation aus einer Kochsalzlösung gemacht werden, zu der vorher so viel Kalium- oder Natriumhydroxyd zugefügt worden war, daß die Edestinlösung gegen Phenolphtalein neutral reagiert. Dies wird am besten erzielt, wenn man durch Titration mit $^1/_{10}$ normalem Alkali die erforderliche Alkalimenge für einen aliquoten Teil des Edestins bestimmt und dann die bestimmte Menge $^1/_{10}$ normaler Lauge zu dem zur Verdünnung der Edestinlösung nötigen Wasser fügt. Sowohl die zur Lösung des Edestins nötige Salzlösung als auch das zur Verdünnung erforderliche Wasser werden durch Sieden von Kohlensäure befreit. Die Edestinlösung wird nach dem Verdünnen in einem geschlossenen Gefäß abkühlen gelassen. Das neutrale Edestin wird so rasch, wie möglich, auf einem *Büchner*schen Trichter abgesaugt und möglichst wenig der Luft ausgesetzt.[2])

Edestin kann auch dargestellt werden durch Extraktion der Hanfsamen mit heißer 3%iger Kochsalzlösung bei 50—60°. In diesem Falle wird die Filtration so schnell wie möglich auf einem Faltenfilter aus weichem Papier ausgeführt unter Anwendung eines Heißwassermantels oder über einem Dampftisch, so daß die Lösung während der Filtration warm bleibt. Da der Rückstand nach der Filtration nicht genügend ausgepreßt werden kann, ohne kalt zu werden, so ist es besser, ihn zusammen mit den Filtern in 3%iger auf 60° erwärmter Natriumchloridlösung zu erhitzen und ihn

[1]) *Osborne*, Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXIII. S. 240 (1901); ebenso *Osborne*, The Basic Character of the Protein Molecule and the Reaction with definite Quantities of Acids and Alkalis. Journ. Amer. Chemical Society. XXIV. p. 39 (1902).

[2]) *Osborne*, Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXIII. S. 265 (1901); ebenso *Osborne*, The Basic Character of the Proteinmolecule and the Reactions of Edestin with definite Quantities of Acids and Alkalis. Journ. Amer. Chemical Society. XXIV. p. 50 (1902).

auf frisches Filtrierpapier zu bringen. Beim allmählichen Abkühlen des filtrierten Extraktes scheidet sich das Edestin in Kristallen ab, die nach erfolgter Filtration mit verdünnter Salzlösung, dann mit 50°/$_0$igem Alkohol gewaschen werden. Das so erhaltene rohe Edestin kann in der soeben beschriebenen Weise durch Umkristallisieren gereinigt werden.

b) Eigenschaften des Edestins.

Elementare Zusammensetzung. Analysen von kristallisiertem Edestin von *Ritthausen*[1], *Osborne*[2], *Chittenden* und *Mendel*[3]) und von *Abderhalden*[4]) haben folgende, gut miteinander übereinstimmende Zahlen ergeben: C 51·3, H 6·9, N 18·7, S 0·9, O 22·2%.

Löslichkeit. Das von Säuren oder Basen völlig freie Edestin ist gänzlich unlöslich in Wasser, aber löslich in neutralen Salzlösungen; wenn es mit einer Menge Salzsäure verbunden ist, die nicht größer ist als 0·7 *cm*³ $^1/_{10}$ Normallösung pro Gramm, so ist es ebenfalls unlöslich in Wasser; mit mehr Säure verbunden wird es proportional dem vorhandenen Säuregehalt löslich.

Die Salze von Edestin mit Säuren sind unlöslich in sehr verdünnten Salzlösungen, hingegen leicht löslich in stärkeren Salzlösungen. Die zur Lösung erforderliche Salzmenge ist proportional der Menge der gebundenen Säure. Bei Gegenwart einer nur kleinen Menge von Säure wird ein Teil des Edestins in Edestan verwandelt, das in Salzlösungen vollständig unlöslich ist.[5]) Die Menge dieses Produktes hängt von dem Betrage der vorhandenen Säure und von der Dauer ihrer Einwirkung ab. Reines und neutrales Edestin ist in den Lösungen der meisten Mineralsalze löslich, jedoch unlöslich in den Lösungen von Kalium-, Natrium- oder Ammoniumacetat.[6]) In Lösungen von starken Basen mit schwachen Säuren, die mit alkalischer Reaktion dissoziiert hydrolytisch sind, ist Edestin löslicher als in Lösungen von Salzen starker Basen mit starken Säuren von entsprechender molekularer Konzentration, während es in Lösungen von Salzen

---

[1]) *Ritthausen,* Zusammensetzung der Eiweißkörper der Hanfsamen und des kristallisierten Eiweiß auf Hanf und Ricinussamen. Journ. f. prakt. Chemie. (2). XXV. S. 130 (1882).

[2]) *Osborne,* Crystallized vegetable Proteids. Amer. Chemical Journ. XIV. p. 662 (1892).

[3]) *Chittenden* and *Mendel,* On the Proteolysis of Crystallized Globulin. Journ. of Physiol. XVII. p. 48 (1894).

[4]) *E. Abderhalden,* Hydrolyse des Edestins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXVII. p. 499 (1903).

[5]) *Osborne,* Ein hydrolytisches Derivat des Globulins Edestin und sein Verhältnis zu *Weyl's* Albuminat und zur Histongruppe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXIII. S. 225 (1901). — Derselbe, A Hydrolytic Derivative of the Globulin Edestin and its relation to *Weyl's* Albuminate and the Histon Group. Journ. Amer. Chemical Society. XXIV. p. 28 (1902).

[6]) cf. *Osborne* and *Harris,* The Solubility of Globulin in Salt Solutions. Amer. Journ. of Physiol. XIV. p. 151 (1905).

schwacher Basen mit starken Säuren, die mit saurer Reaktion hydrolytisch dissoziiert sind, weniger löslich ist.

Edestin ist löslich in gesättigter Natriumchloridlösung, aber unlöslich in gesättigter Magnesiumsulfatlösung.

Hitzekoagulation. In 10%iger Natriumchloridlösung bildet das Edestin beim Erhitzen auf 87° eine leichte Trübung, bei 94° scheiden sich Flocken ab. Wenn die Lösung nach einigem Erhitzen auf 98° filtriert wird, wird durch weiteres Erwärmen der filtrierten Lösung kein Koagulum mehr erzielt. Das nach dem Erhitzen nicht koagulierende Edestin ist wahrscheinlich unverändert, denn es kann durch Dialyse der Lösung in unveränderten Kristallen erhalten werden. Wenn nach dem Sieden eine sehr geringe Säuremenge zu der Lösung gefügt wird, bildet sich bei wiederholtem Sieden ein zweites Koagulum und durch Wiederholung dieses Prozesses kann praktisch sämtliches Edestin in das Koagulum übergeführt werden.[1]) Die zur völligen Koagulation nötige Menge Säure kann nicht auf einmal von Anfang an zugefügt werden, denn diese Menge Säure würde schon vor dem Erhitzen das Edestin aus der Salzlösung ausfällen.

Spezifische Rotation.[2]) Gelöst in 10%iger Natriumchloridlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -41{\cdot}3^0$.[2])

Fällung mit Ammonsulfat.[3]) Nach *Hofmeisters* Methode beginnt die Fällung in $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung mit 3·0 *cm*³ und ist vollständig mit 4·2 *cm*³, was 23 und 35% wirklicher Sättigung entspricht.[3]) In 10%iger Natriumchloridlösung sind die Fällungsgrenzen zwischen 1·8 und 3·0 *cm*³ Sättigung.

Farbreaktionen. Edestin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine mit Ausnahme von *Molisch'* Reaktion.[4])

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [5]), [6]), [7]).

Stickstoffverteilung.[8]) N als NH_3 1·88%, basischer N 5·91%, nicht basischer N 10·78%, N im MgO-Niederschlag 0·12%.

---

[1]) cf. *Chittenden* and *Mendel*, On the Proteolysis of Crystallized Globulin. Journ. of Physiol. XVII. p. 48 (1894).

[2]) *Osborne* and *Harris*, The Specific Rotation of some vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[3]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[4]) *Erb*, Über das Salzsäurebindungsvermögen einiger reiner Eiweißkörper. Zeitschrift f. Biol. XLI. S. 309 (1901), ferner *Osborne* and *Harris*, The Carbohydrate Group in the Protein Molecule. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 474 (1903).

[5]) *E. Abderhalden*, Hydrolyse des Edestins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXVII. S. 499 (1903) und XL. S. 249 (1903).

[6]) *Osborne* and *Gilbert*, The Proportion of Glutaminic acid yielded by various Vegetable Proteins when decomposed by Boiling with Hydrochloric acid. Amer. Journ. of Physiol. XV. p. 333 (1906).

[7]) *Kossel* und *Patten*, Zur Analyse der Hexonbasen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXVIII. S. 39 (1903).

[8]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

2. Excelsin aus der brasilianischen oder Paranuß (Bertholletia excelsa).

Excelsin ist der hauptsächliche Eiweißbestandteil dieser Nuß. Es war das erste künstlich kristallisierte Pflanzenprotein. Diese Kristalle, die durch *Maschke*[1]) erhalten wurden, bilden hexagonale Platten und bestehen aus einem in Wasser unlöslichen Proteinsalz. Im freien Zustand ist Excelsin löslich in Wasser. Excelsin kann daher aus den Nüssen mit reinem Wasser extrahiert werden und scheidet sich daraus, infolge der allmählichen Entwicklung von Säure im Extrakt, in Kristallform ab. *Maschke* erkannte die Tatsache, daß diese Kristalle eine Säureverbindung des Proteins sind.[2])

a) Darstellung des Excelsins.

Die Nüsse werden von ihren Schalen durch Zertrümmern mit einem Hammer befreit und alle ungesunden Kerne ausgelesen. Es ist unnötig, die dunkelgefärbte äußere Samenhaut zu entfernen, denn die Ausbeute an Excelsin wird durch ihre Gegenwart nicht beeinflußt. Die Kerne werden zerkleinert und vom größeren Teil des Öles nach A. 2 *b* befreit. Die ölfreien Mehle machen ungefähr 17% der schalenfreien Nüsse aus.

1 *kg* Mehl wird mit ungefähr 8 *l* einer 3%igen, auf 45—50° erwärmten Ammonsulfatlösung behandelt. Nach etwa einstündiger Digestion wird die Mischung durch feines Tuch gesiebt, der Rückstand mit Filtrierpapier gemischt und nach C. 3 so trocken als möglich gepreßt. Der Auszug wird dann nach C. 1 völlig klar filtriert und nach D. 2 dialysiert.

Das Excelsin, das sich in gut ausgebildeten, von amorphen Bestandteilen völlig freien, hexagonalen Platten abscheidet, wird dann vom Dialysator entfernt und durch Dekantieren gewaschen: zuerst mit 10%igem Alkohol, der 0·25% Natriumchlorid enthält, dann mit 20%igem Alkohol, 0·12% Natriumchlorid enthaltend; hierauf sukzessive mit 40-, 75- und 90%igem Alkohol und zuletzt mit absolutem Alkohol. Nachdem der Alkohol in einem Büchnertrichter auf einer Schicht gehärteten Filtrierpapiers abgesaugt worden ist, wäscht man das Excelsin mit trockenem Äther und trocknet über Schwefelsäure. Die Ausbeute beträgt ungefähr 20% des ölfreien Mehles. Da das Excelsin das einzige Protein des Mehles ist, das durch Dialyse gefällt wird, und da das Volumen der Lösung, aus der es abgeschieden wird, ein verhältnismäßig großes ist, so ist das so erhaltene Produkt sehr rein. Wenn weitere Reinigung erwünscht wird, so kann das Excelsin in einer ungefähr 6%igen Ammonsulfatlösung wieder gelöst (E. 2) und durch Zugabe von mehr Ammonsulfat zur erhaltenen Lösung bis zur $^6/_{10}$-Sättigung wiedergefällt werden. Der so erhaltene Niederschlag wird auf gehärteten

[1]) *Maschke*, Kristallisierte Kaseinverbindung. Journ. f. prakt. Chemie. LXXIV. S. 436 (1858).

[2]) *Maschke*, Über den Bau und die Bestandteile der Kleberbläschen (Kleberkörnchen) in Bertholletia, deren Entwicklung in Rizinus, nebst einigen Bemerkungen über Amylonbläschen. Journ. f. prakt. Chemie. LXXIX. S. 148 (1860).

Faltenfiltern abfiltriert, in verdünnter Ammonsulfatlösung gelöst (E. 1) und, wie oben beschrieben, durch Dialyse wiedergefällt.

Das so erhaltene Excelsin bildet ein dichtes, schneeweißes Pulver, das durch Glitzern im reflektierten Sonnenlicht dem bloßen Auge seinen kristallinischen Charakter offenbart.

b) *Eigenschaften des Excelsins.*

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 52·2, H 6·9, N 18·2, S 1·1, O 21·6%.

Löslichkeit. Das nach der eben beschriebenen Methode dargestellte Excelsin ist unlöslich in Wasser, aber löslich in neutralen Salzlösungen. Wird das Excelsin in destilliertem Wasser suspendiert und mit Natrium- oder Kaliumhydroxyd gegen Phenolphtalein neutralisiert, so ist es völlig löslich. Die so erhaltene Lösung ist, obgleich sie gegen Phenolphtalein neutral ist, gegen Lackmus alkalisch. Excelsin verhält sich demnach gegen Alkali analog wie Edestin, mit der Ausnahme, daß Excelsin in Wasser löslich wird, wenn es gegen Phenolphtalein vollständig neutralisiert wird, während Edestin unlöslich ist.[2]) Es ist sehr wahrscheinlich, daß die saure Reaktion des kristallisierten Excelsins, wie schon beim Edestin bewiesen worden ist, von der gebundenen Säure herrührt, und daß das freie Excelsin in Wasser löslich ist, während seine Salze mit Säuren darin unlöslich sind. Die Excelsinsalze haben die Löslichkeit eines Globulins. Excelsin ist löslich in gesättigten Natriumchloridlösungen.

Hitzekoagulation.[3]) In 10%iger Natriumchloridlösung wird beim allmählichen Erwärmen auf 70° eine Trübung hervorgerufen. Bei weiterem Steigern der Temperatur auf 86° scheiden sich Flocken ab, deren Menge allmählich zunimmt, wenn die Temperatur auf 100° gesteigert wird.

Spezifische Drehung.[4]) In 10%iger Natriumchloridlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -42{\cdot}9^0$.

Fällung mit Ammonsulfat.[5]) Wird Excelsin nach der beschriebenen Methode dargestellt, so wird es nach *Hofmeisters* Methode in $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst, mit 4—5·5 *cm*³ oder bei 32—46% wirklicher Sättigung gefällt.

---

[1]) *Osborne*, Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chemical Journ. XIV. p. 662 (1892), ferner *Osborne* and *Harris*, Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins, 2d Paper. Amer. Journ. of Physiol. XIII. p. 436 (1905).

[2]) *Osborne*, Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXIII. S. 240 (1901).

[3]) *Osborne*, Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chemical Journ. XIV. p. 662 (1892).

[4]) *Osborne* and *Harris*, The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[5]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

Farbenreaktionen. Excelsin gibt alle Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [1])

Stickstoffverteilung. [2]) N als NH_3 1·48, basischer N 5·76, nicht basischer N 10·97, N im MgO-Niederschlag 0·17%.

3. Globulin aus Kürbissamen (Cucurbita maxima).

Die Samen des Kürbis enthalten eine verhältnismäßig große Menge Protein, von dem der größere Teil leicht in oktaedrischen Kristallen erhalten wird. [3]) Die Extrakte dieses Samens ergeben auch eine sehr kleine Menge eines anderen Globulins, das bei einer niedrigeren Temperatur als das kristallinische Globulin koaguliert, und von welchem das letztere durch Umkristallisieren oder Umfällen aus verdünnten Salzlösungen getrennt werden kann.

a) Darstellung des Kürbissamenglobulins.

Wenn man die Samen zur Extraktion vorbereitet, ist es zur Erzielung guter Ausbeuten und farbloser Produkte nicht nötig, die voluminösen Schalen und äußeren Samenhäute vollständig zu entfernen. Will man jedoch eine Trennung herbeiführen, so geschieht dies am besten mit der Hand. Die Samen werden längs der Naht mit einem scharfen Messer aufgeschnitten und der Kern herausgenommen. Die äußere Haut des Kernes wird dann sorgfältig mit dem Messer abgeschabt. Dieser Prozeß schließt so viel Arbeit und Verluste in sich, daß es unpraktisch ist, größere Quantitäten dieses Globulins auf diese Weise darzustellen.

Größere Mengen von Kürbissamenmehl werden erhalten, indem man die Samen grob mahlt, am besten in der Kaffeemühle (S. 275). Durch Sieben des so erhaltenen Produktes auf einem groben Sieb kann ein großer Teil der Schalen entfernt werden, ohne daß man viel von den Kernen verliert. Das gesiebte Mehl wird dann mit Kerosin gemischt und noch einmal auf der Kaffeemühle gemahlen (vgl. A. 2 *a*). Nachdem man das Öl mit Petroläther extrahiert hat, kann der größte Teil der noch vorhandenen Schalen durch Sieben entfernt werden.

1 *kg* dieses Mehles wird mit 4 *l* 10%iger Kochsalzlösung behandelt. Nach tüchtigem Umrühren wird der Auszug nach C. 3 filtriert. Das klar filtrierte Extrakt wird mit dem vierfachen Volumen destilliertem Wasser, das vorher auf 65° erhitzt war, verdünnt. Nach allmählichem Abkühlen im Zimmer auf 20° wird die Lösung im Eisschrank auf ca. 5° gekühlt. Das Globulin scheidet sich in oktaedrischen Kristallen ab und läßt eine fast klare Lösung zurück. Diese wird abgehebert und der Nieder-

[1]) *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of Excelsin. Amer. Journ. of Physiol. XIX. p. 53 (1907).

[2]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[3]) cf. *G. Grübler*, Über ein kristallinisches Eiweiß der Kürbissamen. Journ. f. prakt. Chemie (2). XXIII. S. 97 (1881).

schlag auf einer Schicht gehärteten Filtrierpapiers in einem *Büchner*schen Trichter gesammelt. Nachdem man die Mutterlauge abgesaugt hat, wird der Niederschlag vom Papier weggenommen, durch ein Koliertuch in einer $^1/_2$%igen Natriumchloridlösung suspendiert und noch einmal abgesaugt. Dann wird er sukzessive mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol und mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Die Ausbeute beträgt ungefähr 10% des Mehles und das Produkt, obgleich nur einmal gefällt, ist verhältnismäßig rein infolge des sehr großen Volumens, aus dem es sich allmählich abscheidet und infolge der dichten und festen Konsistenz des kristallinischen Niederschlages.

Die Abwesenheit des löslicheren Samenglobulins wird dargetan durch die Tatsache, daß so zubereitete Lösungen des Globulins in 10%iger Natronlauge vollständig klar bleiben, wenn sie bis 87° erhitzt werden, während Lösungen, die nur einmal durch Dialyse des Extraktes hergestellt waren, bei 73° trübe werden und bei 84° einen flockigen Niederschlag geben.

Das so erhaltene Globulin kann durch Umkristallisieren weiter gereinigt werden, aber dieser Prozeß bedingt gewöhnlich einen großen Materialverlust, da mehr oder weniger Protein bei dieser Fällung in neutralen Salzlösungen unlöslich wird. Wenn das Globulin umkristallisiert werden soll, wird es vom Filter weggenommen und durch ein Siebtuch in Wasser suspendiert. Das Volumen der Suspension wird auf 600 *cm*³ gebracht. Es werden dann 600 *cm*³ 20%iger Natriumchloridlösung zugefügt. Nachdem das unlösliche Produkt sich abgesetzt hat, wird die Lösung sorgfältig durch ein Filter von Papierbrei filtriert. Wenn die Menge des unlöslichen Produktes beträchtlich ist, wird dieses auf ein weiches Faltenfilter gebracht. Nachdem der größte Teil der Lösung abgelaufen ist, werden Niederschlag und Filter auf einer Schicht von Papierbrei abgesogen. Wenn die Quantität des unlöslichen Proteins nur klein ist, kann alles auf einmal auf dem Filterbrei filtriert werden.

Die klare Lösung wird dann mit 4 Volumen auf 65° erhitzten Wassers verdünnt und das Globulin, wie vorher, umkristallisiert.

b) *Eigenschaften des Kürbissamenglobulins.*

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 51·65, H 7·02, N 18·36, S 0·86, O 22·11%.

Diese Zahlen, welche das Mittel sehr nahe übereinstimmender Analysen von *Barbieri*, *Ritthausen*, *Chittenden* und *Hartwell*, *Grübler* und *Osborne* sind, stellen die Zusammensetzung dieses Proteins innerhalb sehr enger Grenzen fest.

Löslichkeit.[1]) Völlig unlöslich in Wasser. Leicht löslich in verhältnismäßig starken Kochsalzlösungen, aber sehr wenig löslich in 2%igen

---

[1]) *Osborne*, Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chemical Journ. XIV. p. 662 (1892).

und verdünnteren Natriumchloridlösungen. Löslich in gesättigter Natriumchloridlösung. Unlöslich in gesättigter Magnesiumsulfatlösung.

Hitzekoagulation.[1]) In 10%iger Natriumchloridlösung erfolgt Trübung beim Erwärmen auf 87°, bei 95° bildet sich ein flockiger Niederschlag. Die von diesem Koagulum abfiltrierte Lösung bleibt beim Sieden klar, gibt aber mit Essigsäure einen reichlichen Niederschlag.

Spezifische Drehung.[2]) In 10%iger Natriumchloridlösung ist $[\alpha]\frac{20^0}{D} = -38{\cdot}73^0$.

Fällung mit Ammonsulfat.[3]) In $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung beginnt die Fällung bei der Bestimmung nach *Hofmeisters* Methode nach Zusatz von 3·3 *cm*³ und ist vollständig mit 4·4 *cm*³ oder bei 26 und 36% wirklicher Sättigung.

Farbreaktionen. Das Kürbissamenglobulin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine, ausgenommen *Molisch*' Reaktion.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [4 u. 5]).

Stickstoffverteilung.[6]) N als NH_3 1·28, basischer N 5·97, nicht basischer N 11·04, N im Mg O-Niederschlag 0·22%.

4. Das Globulin des Baumwollsamens (Gossypium herbaceum).

Die Samen der Baumwollpflanze enthalten eine große Menge Protein, das durch Natriumchloridlösungen extrahiert und durch Dialyse gefällt werden kann. Infolge der großen Quantität von Farbstoffen, die in diesen Samen enthalten sind, ist das so erhaltene Globulin leicht gelb gefärbt. Bis jetzt ist keine Methode gefunden worden, nach welcher farblose Präparate erhalten werden. Neben diesem Globulin wird durch neutrale Salzlösungen oder durch Wasser sehr wenig Protein aus den Samen extrahiert. Fraktionierte Fällung des Globulins hat keinen Hinweis gegeben, daß es eine Mischung von zwei oder mehr Proteinen ist.[7])

a) Darstellung des Baumwollsamenglobulins.

Die Samen werden von ihren Hüllen befreit, indem man sie in einer hölzernen Schale mit einem scharfen Fleischhackmesser zerhackt. Beim

---

[1]) *Osborne*, Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chemical Journ. XIV. p. 662. (1892).

[2]) *Osborne* and *Harris*, The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[3]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteids. Journ. of the Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[4]) *Abderhalden* und *Berghausen*, Die Monoaminosäuren von aus Kürbissamen dargestelltem, kristallinischem Eiweiß. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XLIX. p. 15 (1906).

[5]) *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of the Cristallized Globulin of Squash-Seed. Amer. Journ. of Physiol. XIX. p. 475 (1907).

[6]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. of the Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[7]) *Osborne* and *Voorhees*, The Proteids of Cotton-seed. Journ. Amer. Chemical Society. XVI. p. 778 (1894).

Sieben auf einem groben Sieb kann der größte Teil der öligen Samen von den meisten Hüllen befreit werden. Die Kerne werden dann mit Kerosin gemischt und in der Kaffeemühle gemahlen. Nachdem man den größten Teil des Öles durch Extraktion mit Petroläther oder durch Auspressen auf einer hydraulischen Presse entfernt hat, wird das grobe Mehl in der Kaffeemühle zu einem feinen Pulver gemahlen (S. 275).

Das käufliche Baumwollsamenmehl, das nach dem Auspressen des Öles erhalten wird und häufig als Viehfutter dient, kann auch zur Darstellung des Baumwollsamenglobulins verwendet werden und gibt, soweit bis jetzt bekannt ist, dasselbe Resultat. Um große Quantitäten dieses Globulins herzustellen, ist dieses Mehl eine geeignete Quelle. Für ein sorgfältiges Studium der Proteine müssen jedoch die ganzen Samen verwendet werden, damit die Behandlung, der sie unterworfen werden, von Anfang des Prozesses an bekannt ist. Die Methode der Globulinbereitung ist dieselbe für beide Mehlsorten.

1 *kg* Mehl wird mit 3 *l* 10%iger Kochsalzlösung behandelt, wobei nach C. 3 ungefähr 2300 *cm*³ eines nahezu klaren Extraktes erhalten werden. Dieses wird dann nach C. 1 filtriert und nach D. 2 vier Tage lang dialysiert.

Der größere Teil des Globulins wird so als ein etwas zusammenhängender Niederschlag erhalten, von dem die milchige Lösung sorgfältig abgehebert oder abgegossen wird. Letztere wird dann einige Stunden stehen gelassen. Falls sich ein genügender Niederschlag bildet, wird die Lösung abgehebert und der Niederschlag zu der Hauptmenge des Globulins gefügt.

Die Menge des Proteins, die nach mehrstündigem Stehen noch in der Lösung suspendiert bleibt, ist nicht bedeutend und kann verworfen werden, denn selbst nach mehreren Tagen bleibt die Lösung noch trübe und setzt sehr wenig Globulin ab. Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat beweist, daß nur wenig Protein darin enthalten ist.

Das abgesetzte Globulin wird dann in einem gemessenen Volumen Wasser suspendiert, E. 2, das Volumen der Suspension auf 500 *cm*³ gebracht und darin 76 *g* Ammonsulfatkristalle aufgelöst. Die so in $^2/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung bewerkstelligte Lösung des Globulins wird vervollständigt, indem sie durch ein feines Siebtuch gegossen wird, um alle Klumpen zu zerteilen. Dann wird sie stehen gelassen, bis die unlösliche Substanz sich abgesetzt hat. Die Lösung wird dann auf einem Filter von Papierbrei filtriert, wobei ein Verstopfen des Filters sorgfältig verhindert werden muß. Falls sich viel unlösliche Substanz absetzt, wird diese am besten auf einem Faltenfilter gesammelt. Wenn nur wenig vorhanden ist, kann direkt auf dem Filter von Papierbrei abgesaugt werden. Nachdem man das Filter mit $^2/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen hat, wird das klare Filtrat gemessen und für je 100 *cm*³ 28·1 *g* Ammonsulfatkristalle zugegeben. Die Lösung wird so $^6/_{10}$ gesättigt und das Globulin ausgefällt. Die Lösung bleibt mit der Fällung über Nacht stehen. In dieser Zeit zieht sich der Niederschlag zu einer dichten, zu-

sammenhaftenden Masse zusammen, von der die Lösung gewöhnlich fast völlig dekantiert werden kann, ohne daß Protein verloren geht.

Dieser Niederschlag wird dann in ungefähr 500 *cm*³ 10%iger Kochsalzlösung gelöst und durch Papierbrei klar filtriert (C. 1). Nachdem man die Filter mit der Salzlösung ausgewaschen hat, werden Filtrat und Waschwasser 4 Tage lang dialysiert (D. 2). Der Inhalt des Dialysators wird ungefähr eine Stunde stehen gelassen; hiernach dekantiert man die nahezu klare Lösung so vollständig als möglich. Dann wird der Niederschlag in einem *Büchner*schen Trichter auf eine gehärtete Filtrierpapierschicht gebracht. Nachdem beinahe trocken gesaugt ist, wird der Niederschlag nach F. mit Wasser gewaschen. Der Niederschlag wird dann vom Filter weggenommen, in Alkohol suspendiert, zur feinen Verteilung durch das Siebtuch gegossen und wieder auf das Filter gebracht. Man wiederholt diese Behandlung mit absolutem Alkohol, wäscht den Niederschlag auf dem Filter mit Äther, entfernt ihn vom Filter, zerreibt ihn zu einem feinen Pulver und trocknet über Schwefelsäure.

Das so bereitete Präparat bildet ein leichtes gelbliches Pulver mit folgenden Eigenschaften.

b) *Eigenschaften des Baumwollsamen-Globulins.*

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 52·16, H 6·67, N 18·49, S 0·62, O 22·06%.

Löslichkeit.[1]) Löslich in mäßig verdünnten und gesättigten Lösungen von Natriumchlorid. Unlöslich in reinem Wasser.

Hitzekoagulation.[1]) Teilweise Koagulation beim Erhitzen der 10%igen Kochsalzlösung auf 93—100°.

Spezifische Drehung. Wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat.[2]) In $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung beginnt die Fällung bei Anwendung der *Hofmeister*schen Methode nach Zusatz von 4·6 *cm*³ und ist vollständig mit 6·4 *cm*³, was 38 und 56% wirklicher Sättigung entspricht.

Farbreaktionen. Das Baumwollsamenglobulin gibt alle üblichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [3 u. 4])

Stickstoffverteilung.[5]) N als NH_3 1·92%, basischer N 5·71%, nicht basischer N 11·01%.

---

[1]) *Osborne* and *Voorhees,* The Proteids of Cotton-seed. Journ. Amer. Chemical Society. XVI. p. 778 (1894).

[2]) *Osborne* and *Harris,* The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[3]) *Abderhalden* und *Rostoski*, Die Monoaminosäuren des „Edestins" aus Baumwollsamen und dessen Verhalten gegen Magensaft. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XLIV. p. 265 (1905).

[4]) *Osborne, Leavenworth* and *Brautlecht,* The Different Forms of Nitrogen in Proteins. Amer. Journ. of Physiol. XXIII. p. 180 (1908).

[5]) *Osborne* and *Harris,* Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

5. Amandin aus Mandeln (*Prunus amygdalus*).

Der größere Teil des Proteins dieses Samens besteht aus Amandin, das entweder mit Wasser oder Kochsalzlösung extrahiert werden kann. Extrakte mit Salzlösungen enthalten neben Amandin nur sehr wenig Proteose.[1])

Die Samen des Pfirsichs (Prunus persica) enthalten ein Protein, das mit dem Amandin der Mandel wahrscheinlich identisch ist.

Amandin ist in Wasser löslich, wenn es von gebundener Säure durch Neutralisation mit Alkali befreit wird. Wenn es mit einer kleinen Menge Säure zu einem Proteinsalz verbunden ist, ist es unlöslich in Wasser und löslich in Salzlösungen und besitzt in diesem Zustande die Eigenschaften eines Globulins.

Wässerige Extrakte der Mandel geben bei Sättigung mit Ammonsulfat Niederschläge. Diese liefern, wenn sie in Kochsalzlösung gelöst sind nach Dialyse Amandin in Form von sehr kleinen Sphäroiden, die sich bald zu einem halbflüssigen, durchsichtigen Niederschlag vereinigen. Diese Abscheidung wird durch die Säure bewirkt, die sich im Extrakt entwickelt und sich mit dem Amandin zu einem Salz mit Globulineigenschaften vereinigt. Kristallinische Präparate sind aus der Mandel nicht erhalten worden.

a) *Darstellung von Amandin.*

Die Schalen der Mandeln werden mit der Hand entfernt und ihre äußere Haut losgelöst, indem man die Kerne wenige Sekunden in heißes Wasser eintaucht und zwischen den Fingern preßt. Wenn sie von den Häuten befreit sind, wird der größte Teil des Öles entfernt, indem man sie nach A. 2*b* durch eine Fruchtpresse preßt. Das von der Hauptmenge des Öles befreite Mehl wird dann zu einem feinen Pulver zermahlen.

Ein Kilogramm des Mehles wird mit 5 *l* 10⁰/₀iger Kochsalzlösung behandelt und auf große Faltenfilter von weichem Papier (*Schleicher-Schüll*, Nr. 580) gebracht. Wenn die Lösung zum großen Teil durchgegangen ist, wird der Rückstand auf dem Filter, wie unter C. 3 beschrieben, mit einer genügenden Menge Filtrierpapier gemischt und die halbfeste Masse einem hohen Druck ausgesetzt.

Der Preßrückstand wird mit 3 *l* 10⁰/₀iger Kochsalzlösung aufgerührt und noch einmal gepreßt. Nachdem man den ganzen Auszug durch eine Schicht von Papierbrei nach C. 1 filtriert hat, wird er mit Ammonsulfat gesättigt und die Proteinfällung auf einem großen, gehärteten Faltenfilter abfiltriert. Der Niederschlag wird dann in Wasser gelöst, dem man Kochsalz zufügt, falls das am Niederschlag haftende Ammonsulfat zur Lösung nicht genügt. Die Lösung wird dann, ohne weitere Filtration, 4 oder 5 Tage nach D. 2 dialysiert.

---

[1]) cf. *Osborne* and *Campbell*, Conglutin and Vitellin. Journ. Amer. Chemical Society. XVIII. p. 609 (1896).

Das so gefällte Amandin wird auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert und in 2 *l* Wasser suspendiert. Dann werden 760 *g* Ammonsulfat abgewogen und ein Teil desselben unter Aufrühren des Proteins zur Suspension hinzugegeben, bis sich alles gelöst hat. Dann wird der Rest des Sulfats zugefügt und das Amandin aus der so resultierenden halbgesättigten Lösung gefällt. Diese Fällung wird dann auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt, in 10%iger Natriumchloridlösung wieder gelöst, die Lösung nach C. 1 völlig klar filtriert und nach D. 2 chloridfrei dialysiert.

Das ausgefällte Amandin wird dann absetzen gelassen, die Lösung abgehebert und der Niederschlag auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt, mit Wasser und dann mit Alkohol (F.) gewaschen, vom Filter entfernt, unter absolutem Alkohol zu einem wasserfreien Pulver zerrieben und auf einem *Büchner*schen Trichter vom Alkohol abgesaugt und mit Äther gewaschen. Das Präparat ist nach dem Trocknen über Schwefelsäure ein schneeweißes Pulver, das gewöhnlich ungefähr 25% des ölfreien Mehles oder 12% der Mandel in natürlichem Zustande entspricht.

b) Eigenschaften des Amandins.

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 51·4, H 6·9, N 19·0, S 0·4, O 22·3%.

Löslichkeit.[1]) Das nach obigen Angaben bereitete Amandin bildet mit kaltem Wasser eine gummiartige, plastische Masse und löst sich in geringem Maße. In Wasser von ca. 98° bildet Amandin eine durchsichtige, schleimige Masse. Ein beträchtlicher Teil löst sich und scheidet sich beim Abkühlen wieder ab. Die Lösung in heißem Wasser wird beim Sieden leicht trübe. Dieser lösliche Teil des Präparates ist wahrscheinlich eine Verbindung des Amandins, der saurer ist als der unlösliche Teil. Der Niederschlag, der sich beim Abkühlen der heißen wässerigen Lösung bildet, ist nach Zusatz von wenig Salpetersäure völlig löslich, wird mehr Salpetersäure zugefügt, so fällt ein Niederschlag, der sich beim Erwärmen ähnlich wie eine Proteose löst und in der Kälte wieder erscheint. Amandin wird in Kochsalzlösung bei Sättigung mit Natriumchlorid nicht ausgefällt. Auch mit Merkurichlorid wird aus der Natriumchloridlösung des Amandins nichts abgeschieden.

Hitzekoagulation.[1]) Eine 10%ige Kochsalzlösung, die 5% Amandin enthält, wird trübe, wenn sie auf 75° erhitzt wird. Bei 80° findet geringe Flockenbildung statt, die beim allmählichen Steigen der Temperatur intensiver wird. Doch wird selbst beim Sieden nur ein kleiner Teil des Amandins koaguliert.

Spezifische Drehung.[2]) In 10%iger Kochsalzlösung ist $[\alpha]\frac{20^{\circ}}{D} =$ $= -56{\cdot}4^{\circ}$.

---

[1]) *Osborne* and *Campbell*, Conglutin and Vitellin. Journ. Amer. Chemical Society. XVIII. p. 609 (1896).

[2]) *Osborne* and *Harris*, Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

Fällung mit Ammonsulfat.[1]) Aus einer $^1/_{10}$ gesättigten Ammonsulfatlösung wird Amandin nach *Hofmeisters* Bestimmungsmethode zwischen 3·5 und 5·3 *cm*³ gefällt, was 28—44% wirklicher Sättigung entspricht.

Farbreaktionen. Amandin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine. Die *Molisch*sche Reaktion ist bei sorgfältig gereinigten Präparaten nur sehr schwach und ist wahrscheinlich durch eine schwer zu entfernende Spur von Verunreinigung verursacht.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [2])

Stickstoffverteilung.[3]) N als NH_3 3·05, basischer N 4·15, nicht basischer N 11·55, N im MgO-Niederschlag 0·17%.

6. Juglansin aus Walnuß (Juglans regia).

Die Walnuß enthält eine große Menge Globulin, das leicht aus dem ölfreien Mehl der Kerne gewonnen werden kann. Es ist jedoch notwendig, vor der Extraktion die äußeren Samenhäute zu entfernen, denn diese enthalten so viel Tannin, daß dadurch fast sämtliches Protein unlöslich wird.

a) Darstellung von Juglansin.

Die Nußschalen werden mit der Hand entfernt und die Kerne während einiger Sekunden in heißes Wasser getaucht, bis die Häute gelockert werden. Diese werden dann mit einem Messer abgezogen und die Kerne schnell getrocknet, indem man sie auf Filtrierpapier oder sonst eine absorbierende Substanz legt. Die Kerne werden hierauf von der größeren Menge ihres Öles befreit, entweder in der Fruchtpresse nach A. 2 *b* oder durch Zermahlen und Auspressen und nachherige Extraktion mit Petroläther oder Äther. Das Mehl wird dann in der Kaffeemühle (S. 275) zu einem feinen Pulver zermahlen. 1 *kg* Mehl wird mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung behandelt und der Auszug nach C. 3 filtriert. Das klare Extrakt wird dann mit Ammonsulfat gesättigt und der Niederschlag auf gehärtete Faltenfilter gebracht und über Nacht der Filtration überlassen. Der Niederschlag wird dann in 2 *l* 10%iger Natriumchloridlösung gelöst, die Lösung nach C. 1 klar filtriert und dann 5 Tage lang dialysiert, D. 2.

Der Inhalt des Dialysators wird in einen Zylinder gebracht und absetzen gelassen. Die Lösung wird dann abgehebert, der Niederschlag in 2 *l* 10%iger Natriumchloridlösung gelöst, E. 2. Die resultierende Lösung wird noch einmal klar filtriert, C. 1, und noch einmal 5 Tage lang dialysiert, D. 2. Der Inhalt des Dialysators wird dann wieder in einen Zylinder gegossen. Nach dem Absetzen des Proteins wird die Lösung abgehebert und

---

[1]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[2]) *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of Amandin from the Almond. Amer. Journ. of Physiol. XX. p. 470 (1908).

[3]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Society. XXV. p. 323 (1903).

der Niederschlag auf einer gehärteten Papierschicht in einen *Büchner*schen Trichter so trocken wie möglich abgesaugt.

Das Juglansin wird dann durch Suspension in 0·5%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Die Suspension wird durch ein Koliertuch gegossen und nach dem Absetzen und Abhebern der größten Menge der Lösung auf einem Büchnertrichter trocken gesaugt. Das so gewonnene Juglansin entwässert man dann durch sukzessives Waschen mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol. Schließlich wird Äther zugegeben und das Proteïn in einem warmen Luftstrom oder über Schwefelsäure im Exsikkator getrocknet.

Die Ausbeute beträgt nach dieser Methode ungefähr 200 *g* oder 20% des ölfreien Mehles. Das so bereitete Juglansin bildet ein schneeweißes, dichtes Pulver.

b) Eigenschaften des Juglansins

Elementare Zusammensetzung.[1 u. 2] C 50·80; H 6·84; N 18·96; S 0·80; O 22·50%.

Löslichkeit.[1] Juglansin ist in Wasser unlöslich, aber leicht löslich in neutralen Salzlösungen und in sehr stark verdünnten Säuren und Alkalien. In Lösungen, die mit 10%iger Natriumchloridlösung erhalten worden sind, werden durch Sättigung mit Kochsalz geringe Fällungen erzeugt. Reichlichere Niederschläge bilden sich durch Sättigung mit Magnesiumsulfat.

Hitzekoagulation.[1] 5% Juglansin, in 10%iger Kochsalzlösung aufgelöst, geben beim Erhitzen auf 80° eine leichte Trübung und bei 99° ein flockiges Koagulum. Beim Sieden koaguliert etwas mehr, doch wird Juglansin durch Hitze nur sehr langsam und unvollständig koaguliert.

Spezifische Drehung.[3] In 10%iger Kochsalzlösung ist $[\alpha]_D^{20^\circ} = -45·21°$.

Fällung mit Ammonsulfat.[4] In $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung erfolgt die Fällung nach der Bestimmungsmethode von *Hofmeister* zwischen 2·8 *cm*³ und 4·6 *cm*³, was 21·7% und 36·4% wirklicher Sättigung entspricht.

Farbenreaktionen. Juglansin gibt mit Ausnahme der *Molisch*schen Reaktion die üblichen Farbenreaktionen der Proteine.

Der Gehalt des Juglansins an Aminosäuren ist noch nicht bestimmt worden.

Stickstoffverteilung.[5 u. 2] (J. nigra) N als NH_3 1·77, basischer N 5·61, nicht basischer N 11·33, N im MgO-Niederschlag 0·19%.

---

[1]) *Osborne* and *Campbell*, Conglutin and Vitellin. Journ. Amer. Chemical Society. XVIII. p. 609 (1896).

[2]) *Osborne* and *Harris*, The Globulin of the English Walnut, the American Black Walnut and the Butternut. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 848 (1903).

[3]) *Osborne* and *Harris*, The Specific Rotation of Some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[4]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[5]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

7. *Legumin aus Erbse (Pisum sativum), Linse (Ervum lens), Saubohne (Vicia faba), Wicke (Vicia sativa).*

Der Name Legumin wurde früher benutzt, um die Proteinsubstanz aus einer großen Zahl verschiedener Leguminosensamen zu bezeichnen, aber spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Präparate aus vielen dieser Samen deutliche Unterschiede zeigen.

Die Präparate jedoch, welche aus der Erbse (Pisum sativum), Saubohne (Vicia faba), Linse (Ervum lens) und Wicke (Vicia sativa) erhalten werden, zeigen gleiche elementare Zusammensetzung und gleiche Reaktionen, und da der Name Legumin zuerst benutzt worden war, um diese Samenproteine zu bezeichnen, ist dieser Name für das hauptsächliche, aus ihnen erhaltene Protein reserviert worden.

Daß das Legumin aller dieser Samen wirklich identisch ist, ist unwahrscheinlich gemacht worden durch die Ergebnisse der Hydrolyse von aus Erbsen und Wicken gewonnenen Präparaten. Obgleich die Mengen der aus beiden Präparaten erhaltenen Aminosäuren nahezu dieselben sind, scheinen die gefundenen Unterschiede dennoch die wahrscheinlichen Grenzen der Analysenirrtümer zu überschreiten. Jedoch scheint es in Erwägung der großen Ähnlichkeit der Präparate aus den vier oben genannten Samen am besten, sie vorläufig als Legumin zu bezeichnen.

Die Leguminpräparate, die hier beschrieben werden, sind Proteinsalze, welche die Eigenschaften von Globulinen besitzen. Wird das Legumin durch Neutralisation gegen Phenolphtalein von der gebundenen Säure befreit, so wird es löslich in Wasser. Dies erklärt die Tatsache, daß Wasser das Legumin aus frisch gemahlenen Samen extrahiert, und daß der Extrakt beim Stehen das gelöste Protein abscheidet, weil sich im Extrakt Säure entwickelt. Es war früher angenommen worden, daß das Legumin durch die lösende Wirkung der Alkaliphosphate in Lösung gebracht werde, und daß die Hinzufügung von Säure durch Neutralisation Fällung erzeugt. Aus diesem Grunde nannte *Liebig* dieses Protein „Pflanzenkasein".

Es war wiederholt behauptet worden, daß das Legumin phosphorhaltig sei; wenn es aber sorgfältig gereinigt wird, kann es vollständig phosphorfrei erhalten werden. Es ist darum kein Nukleoprotein oder Nukleoalbumin.

Das Legumin bildet nur einen Teil des Proteins dieser Samen. In den Samen der Saubohne, der Linse und Erbse findet es sich zusammen mit einem anderen Globulin von ähnlichen Eigenschaften und ähnlicher Zusammensetzung. Dieses ist löslicher in sehr verdünnten Salzlösungen und sehr hoch konzentrierten Ammonsulfatlösungen. Dieses letztere Globulin, das Vicilin genannt worden ist, ist in den Samen der Wicken nicht gefunden worden. Alle vier Samensorten enthalten auch ein Protein, das weder durch Dialyse noch durch Verdünnung aus den Salzlösungen gefällt wird. Beim Erwärmen desselben auf 80° scheidet es sich jedoch ab. Dieses Protein,

Legumelin, hat die Eigenschaften eines Albumins. Alle vier Samenarten geben auch eine kleine Menge von Proteosen.[1])

a) Darstellung des Wickenlegumins.

Legumin wird am leichtesten aus den Samen der Wicke erhalten, da diese kein Vicilin enthalten, von dem das Legumin nur schwierig völlig getrennt werden kann.

Die Samen aller hier genannten Spezies werden zur Extraktion nach A. 1 vorbereitet.

1 *kg* Wickenmehl wird mit 4 *l* 10%iger Kochsalzlösung gemischt, die genügend Baryt enthält, um das Extrakt gegen Lackmus neutral zu machen. Die notwendige Menge Baryt wird bestimmt, indem man eine Portion von 100 *g* Mehl für sich mit einer gemessenen Menge kalt gesättigter Barytlösung neutralisiert.

Die berechnete Menge Barytlösung wird dann mit einem gleichen Volumen 20%iger Natriumchloridlösung gemischt und die Mischung mit einer 10%igen Kochsalzlösung auf 4 *l* gebracht. Nachdem man das Mehl tüchtig mit der Salzlösung gemischt hat, wird sofort alles nach C. 3 behandelt. Der nach C. 1 filtrierte Auszug wird dann mit Ammoniumsulfat gesättigt und die Fällung auf einem großen Faltenfilter von gehärtetem Papier filtriert. Der Niederschlag wird zusammen mit der anhaftenden Ammonsulfatlösung nach E. 3 behandelt und die erhaltene Lösung von der kleinen Menge gewöhnlich darin enthaltener unlöslicher Stoffe abfiltriert (C. 1).

Die klare Lösung wird drei Tage lang in laufendem Wasser dialysiert, D. 2. Der Inhalt des Dialysators wird in einen Zylinder gebracht, absetzen gelassen, die Lösung abgehebert und der Niederschlag auf einem mit gehärtetem Papier belegten *Büchner*schen Trichter so trocken wie möglich gesogen. Der Niederschlag von rohem Legumin wird dann in 10%iger Kochsalzlösung gelöst (E. 2), die Lösung, wenn nötig, völlig klar filtriert (C. 1) und das Legumin durch viertägige Dialyse in laufendem Wasser gefällt.

Die einzigen anderen im Extrakt der Wickensamen enthaltenen Proteine sind eine verhältnismäßig geringe Menge von Legumelin und sehr wenig Proteosen. Das nach der eben beschriebenen Methode dargestellte Legumin ist daher nahezu rein. Die Gegenwart von beigemischtem Legumelin wird durch Lösen einer Probe des Präparates in 10%iger Kochsalzlösung und Erwärmen auf 80° in einem Wasserbad nachgewiesen. Ist Legumelin vorhanden, so wird es koagulieren.

Wenn eine weitere Reinigung des Legumins erwünscht wird, kann dieses durch Wiederholung der Fällung durch Dialyse erzielt werden oder durch Fällung seiner Natriumchloridlösung mittelst Verdünnung mit so viel kaltem

[1]) Cf. *Osborne* and *Campbell*, Legumin and other Proteids of the Pea and Vetch. Journ. Amer. Chemical Society, XVIII, p. 583 (1896). — Dieselben, Proteids of the Pea. Ibid. XX, p. 348 (1898). — Dieselben, Proteids of the Lentil. Ibid. XX, p. 362 (1898). — Dieselben, Proteids of the Horse Bean. Ibid. p. 393 (1898). — Dieselben, Proteids of the Vetch. Ibid. XX, p. 406 (1908). — Dieselben, Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Ibid. XX, p. 410 (1898).

destillierten Wasser, daß der Gehalt an Kochsalz auf 1% oder weniger gebracht wird.

b) Darstellung des Legumins aus der Erbse, Saubohne und Linse.

Man behandelt 1 *kg* feines Mehl mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung, die genügend Baryumhydroxyd enthält, um die Lösung gegen Lackmus zu neutralisieren. Der Auszug wird nach C. 3 völlig klar filtriert, dann mit Ammonsulfat gesättigt und der Niederschlag nach E. 3 gelöst.

Die resultierende Lösung wird dann dialysiert, bis sämtliches Globulin gefällt ist. Dieser Punkt kann bestimmt werden, wenn man ein wenig des filtrierten Dialysatorinhaltes in ein großes Volumen destillierten Wassers bringt. Wenn durch die so filtrierte Lösung keine Trübung erfolgt, werden die gefällten Globuline auf gehärteten Faltenfiltern abfiltriert. Der Niederschlag, der eine Mischung von Legumin und Vicilin ist, wird dann in 1 *l* Wasser suspendiert und durch Zusatz von 76 *g* Ammoniumsulfatkristallen gelöst, E. 1.

Die resultierende Lösung wird, ohne von der gewöhnlich vorhandenen kleinen Menge unlöslichen Proteins abzufiltrieren, durch Lösen von 380 *g* Ammonsulfatkristalle auf $^{6}/_{10}$-Sättigung gebracht. Der Niederschlag wird dann auf einem Faltenfilter von gehärtetem Papier abfiltriert und von anhaftendem Sulfat durch Pressen zwischen Filtrierpapier befreit. Das Filtrat dieses Niederschlages enthält praktisch sämtliches Vicilin. Soll dieses Protein gewonnen werden, so wird nach S. 309 verfahren. Um das Vicilin so vollständig als möglich zu trennen, ist es nötig, die anhaftende Sulfatlösung so sorgfältig wie möglich zu entfernen. Die kleine, am Niederschlag haftende Menge Vicilin wird durch die nachfolgende Behandlung abgetrennt. Der Niederschlag wird dann nach E. 2 gelöst und das Gesamtvolum auf 1 *l* gebracht. 450 *g* Ammoniumsulfat werden dann zugefügt und die Lösung hierdurch auf nahezu $^{6}/_{10}$-Sättigung gebracht.

Der Niederschlag wird dann in 10%iger Kochsalzlösung nach E. 2 gelöst, die Lösung völlig klar filtriert (C. 1), eventuell drei Tage lang in laufendem Wasser dialysiert. Die verdünnte Salzlösung, die man so bekommt, enthält etwas Legumin und alles Vicilin und Legumelin. Das gefällte Legumin wird dann auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert, mit Wasser chlorfrei gewaschen, mit absolutem Alkohol entwässert, mit Äther extrahiert und getrocknet.

c) Eigenschaften des Legumins.

Elementare Zusammensetzung.[1])

Legumin Wicke	C 51·69; H 6·99; N[1]) 18·02; S 0·43; O 22·87.
Legumin Saubohne	C 51·72; H 7·01; N[1]) 18·06; S 0·39; O 22·82.
Legumin Linse	C 51·73; H 6·89; N[1]) 18·06; S 0·40; O 22·92.
Legumin Erbse	C 51·74; H 6·90; N[1]) 18·04; S 0·42; O 22·90.

[1]) N = Stickstoff nach der Methode von *Dumas*.

Löslichkeit.[1]) Das nach der beschriebenen Methode dargestellte Legumin ist in Wasser unlöslich, aber in Kochsalzlösungen von zwei und mehr Prozent löslich. In stark verdünnten Salzlösungen ist es nur wenig löslich. Wird es von gebundener Säure durch Neutralisation gegen Phenolphtalein befreit, so ist das Legumin löslich in Wasser.[2]) Salzlösungen von Legumin werden durch Sättigung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat nicht gefällt.

Hitzekoagulation.[3]) Wenn Legumin völlig frei von Vicilin und Legumelin ist, so kann man seine Natriumchloridlösungen einige Zeit lang kochen, ohne daß Trübung auftritt. Wenn jedoch vorher ein wenig Essigsäure zugefügt wird, so erfolgt beim Sieden eine intensive Koagulation.

Spezifische Drehung.[4]) Das Legumin der Saubohne zeigt in 10%iger Kochsalzlösung $[\alpha]\frac{20^0}{D} = -43{\cdot}64^0$.

Fällung mit Ammonsulfat.[5]) Nach der beschriebenen Methode dargestellte Leguminpräparate werden nach *Hofmeisters* Bestimmungsweise zwischen 5·5 und 7·5 cm^3 gefällt, d. h. zwischen 46 und 67% wirklicher Sättigung.

Farbenreaktionen. Legumin gibt alle Farbenreaktionen der Proteine. Die Reaktion mit *Molisch'* Reagens ist schwach und bei verschiedenen Präparaten verschieden stark. Es ist daher wahrscheinlich, daß diese Reaktion durch eine sehr geringe Verunreinigung verursacht wird.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [6 u. 7])

Stickstoffverteilung.[8]) Erbse: N als NH_3 1·69; basischer N 5·11; nicht basischer N 10·97; N im MgO-Niederschlag 0·27%.

Linse: N als NH_3 1·69; basischer N 5·16; nicht basischer N 11·03; N im MgO-Niederschlag 0·11.

Saubohne: N als NH_3 1·62; basischer N 4·92; nicht basischer N 11·34; N im MgO-Niederschlag 0·11.

Wicke: N als NH_3 1·75; basischer N 5·17; nicht basischer N 10·90; N im MgO-Niederschlag 0·18.

[1]) *Osborne* and *Campbell,* The Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Journ. Amer. Chemical Society. XX. p. 410 (1898).

[2]) *Osborne,* Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins gegen bestimmte Mengen von Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XXXIII. p. 240 (1901).

[3]) *Osborne* and *Campbell,* The Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Journ. Amer. Chemical Society. XX. p. 410 (1898).

[4]) *Osborne* and *Harris,* The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[5]) *Osborne* and *Harris,* The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[6]) *Osborne* and *Heyl,* Hydrolysis of Vetch Legumin. Amer. Journ. of Physiol. XXII. p. 423 (1908).

[7]) *Osborne* and *Clapp,* Hydrolysis of Legumin from the Pea. Journ. of Biological Chemistry. III. p. 219 (1907).

[8]) *Osborne* and *Harris,* Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

8. Vicilin
aus Erbse (Pisum sativum), Linse (Ervum lens), Saubohne (Vicia faba).

Vicilin, das einen Teil der Globuline der Erbse, Linse und Saubohne bildet, unterscheidet sich in Zusammensetzung und Eigenschaften vom Legumin und ist eine verschiedene Substanz.

Vicilin enthält ein wenig mehr Kohlenstoff, etwas weniger Stickstoff und weniger als halb so viel Schwefel wie Legumin; es ist löslicher in verdünnten Salzlösungen und durch Ammonsulfat weniger leicht wie das Legumin fällbar. Seine Ähnlichkeit mit dem Legumin läßt eine genetische Verwandtschaft vermuten, aber seine Abwesenheit im Wickensamen zeigt, daß dies offenbar nicht der Fall ist.

Von den drei oben erwähnten Samen sind zahlreiche Vicilinpräparate erhalten worden, die in bezug auf Eigenschaften und Zusammensetzung sehr nahe miteinander übereinstimmen.

Vicilin bietet besonderes Interesse, da es weniger Schwefel enthält als irgend ein anderes bekanntes Protein. Der Schwefelgehalt einer großen Zahl von Präparaten liegt zwischen 0·1 und 0·25%. Ein Teil dieses Schwefels gibt, wie der Schwefel aller anderen Proteine, beim Sieden mit Ätzkali Sulfide.

Vicilin kann aus den Kochsalzlösungen durch fraktionierte Fällung vom Legumin getrennt werden. Diese Methode bedingt aber Verlust an Substanz und erfordert viel Zeit. Es wird leichter durch Fällung mit Ammonsulfat vom Legumin getrennt, denn bei $^6/_{10}$-Sättigung wird das Legumin gefällt, während Vicilin erst bei $^7/_{10}$-Sättigung ausfällt.

a) Darstellung von Vicilin.

Vicilin wird am besten aus dem Filtrat der in $^6/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung erfolgten ersten Leguminfällung erhalten (vgl. S. 307). Dieses Filtrat wird mit Ammonsulfatlösung gesättigt, der Niederschlag auf einem gehärteten Faltenfilter filtriert, das anhaftende Sulfat so gut wie möglich durch Pressen zwischen Filtrierpapier entfernt und dann in 1 *l* Wasser gelöst. 400 *g* kristallisiertes Ammonsulfat werden dann in der Lösung gelöst. Dies genügt, um im Verein mit der am Niederschlag haftenden gesättigten Sulfatlösung die Konzentration des Salzes auf nahezu $^6/_{10}$-Sättigung zu bringen.

Wenn ein Niederschlag von wenig Legumin gebildet wird, wird dieser abfiltriert und das Filtrat mit Ammonsulfat gesättigt. Der Niederschlag von Vicilin, der sich nach der Sättigung mit Ammonsulfat abscheidet, wird dann in Wasser gelöst und die filtrierte Lösung so lange dialysiert, bis eine Probe beim Eingießen in reines Wasser keine Trübung mehr gibt.

Der durch Dialyse gebildete Niederschlag von Vicilin wird dann auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt, mit Wasser (F.) und dann mit Alkohol gewaschen, mit absolutem Alkohol entwässert, mit trockenem Äther gewaschen und zuletzt im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

b) Eigenschaften des Vicilins.[1]

Elementare Zusammensetzung.

Vicilin Erbse	C 52·36; H 7·03; N 17·05; S 0·18; O 23·38.
Vicilin Linse	C 52·13; H 7·02; N 17·24; S 0·17; O 23·44.
Vicilin Saubohne	C 52·38; H 7·04; N 17·52; S 0·15; O 23·39.

Löslichkeit. Vor dem Trocknen ist Vicilin unlöslich in Wasser, doch ist es reichlich löslich in 1—2%igen Kochsalzlösungen. Nach Behandeln mit Alkohol und Trocknen über Schwefelsäure ist gewöhnlich ein großer Teil des Präparates in Salzlösungen unlöslich geworden.

Hitzekoagulation. Vicilinlösungen in 10%iger Kochsalzlösung werden bei 90° trübe, bei 95° scheiden sich Flocken ab. Bei andauerndem Erhitzen auf 100° wird Vicilin beinahe völlig koaguliert.

Spezifische Drehung wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat. Infolge der Schwierigkeit der völligen Trennung von Vicilin und Legumin sind die Fällungsgrenzen nicht genau bestimmt worden. Vicilin wird meist zwischen $^7/_{10}$ und $^8/_{10}$ wirklicher Sättigung ausgefällt.

Farbenreaktionen. Vicilin gibt alle üblichen Farbenreaktionen der Proteine. Die Reaktionen mit *Molisch*' Reagens variieren bei den verschiedenen Präparaten so stark, daß es wahrscheinlich ist, daß diese Reaktion von einer leichten Verunreinigung durch Kohlehydrate herrührt.

Gehalt an Aminosäuren: Vicilin (Erbse): vgl.[2])

Stickstoffverteilung.[3]) Erbse: N als NH_3 1·67, basischer N 4·92, nicht basischer N 10·58, N im MgO-Niederschlag 0·23%.

Linse: N als NH_3 1·75, basischer N 4·59, nicht basischer N 10·77, N im MgO-Niederschlag 0·13%.

Saubohne: N als NH_3 1·93, basischer N 4·53, nicht basischer N 10·35, N im MgO-Niederschlag 0·23%.

9. Phaseolin aus Bohnen (Phaseolus vulgaris).

Phaseolin, das beinahe die ganze Proteinsubstanz dieses Samens bildet, ist ein Globulin, das in verhältnismäßig verdünnten Salzlösungen löslich ist. Es war früher mit dem Legumin anderer Spezies von Leguminosensamen identifiziert worden. Da aber späteres Studium gezeigt hat,

[1]) cf. *Osborne* and *Campbell*, The Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Journ. Amer. Chemical Society. XX. p. 410 (1898).

[2]) *Osborne* and *Heyl*, Hydrolysis of Vicilin from the Pea (Pisum sativum). Journ. of Biol. Chemistry. V. p. 187 (1908).

[3]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

daß es von anderen auf ähnliche Weise erhaltenen Proteinen anderer Genera der Leguminosen verschieden ist, wurde es Phaseolin genannt.[1])

Es waren einige Male Phaseolinpräparate dargestellt worden, die hauptsächlich aus oktaedrischen Kristallen bestanden. Es konnte aber kein Präparat gewonnen werden, das nur Kristalle aufwies. Die Kristallisationsbedingungen sind derart, daß es nicht möglich ist, eine Methode zu beschreiben, die ein wohlcharakterisiertes Produkt gibt.

In den Bohnenextrakten ist auch ein leichter lösliches Globulin, Phaselin, und etwas Proteose enthalten.

Fraktionierte Fällungen des Phaseolins ergaben unter verschiedenen Bedingungen Produkte von konstanter Zusammensetzung.[2])

a) Darstellung von Phaseolin.

Die Bohnen werden grob gemahlen und vom größeren Teil ihrer äußeren Samenhäute durch Sieben durch ein grobes Sieb befreit. Dem groben Mehl wird dann der größte Teil seines Ölgehaltes durch Extraktion mit Petroläther entzogen. Nachdem der Petroläther entfernt ist, wird das grobe Mehl noch einmal zu einem möglichst feinen Pulver gemahlen. Die meisten zurückbleibenden Samenhäute werden durch Sieben entfernt, A. 1.

1 *kg* des fein gemahlenen Mehles wird mit 4 *l* 2%iger, auf 80° erwärmter Kochsalzlösung behandelt. Die Mischung von Mehl und Lösungsmittel wird wiederholt umgerührt und mindestens 3 Stunden stehen gelassen, denn beim sofortigen Filtrieren scheidet sich aus dem Extrakt eine Substanz ab, welche die Filtration sehr erschwert. Die Abscheidung dieser Substanz vor der Filtration erleichtert diesen Prozeß sehr. Die Mischung wird dann auf Faltenfilter (*Schleicher-Schüll*, Nr. 580, 50 *cm*) mit gehärteten Spitzen gebracht. Wenn ein beträchtlicher Teil der Lösung abfiltriert ist, wird der Rückstand ausgepreßt und der Auszug nach C. 1 völlig klar filtriert.

Die Lösung muß im durchfallenden Licht frei von sichtbaren Bestandteilen sein, im reflektierten Licht ist sie etwas opaleszent. Sie wird 4 Tage im laufenden Wasser nach D. 2 dialysiert. Der gebildete Niederschlag wird aus dem Dialysator entfernt, absitzen gelassen, die überstehende Flüssigkeit abgehebert und der Niederschlag auf einer Schicht gehärteten Filtrierpapiers im *Büchner*schen Trichter filtriert.

Nachdem man so trocken als möglich abgesaugt hat, wird das Phaseolin vom Papier weggenommen, in Wasser suspendiert und durch ein Siebtuch gegossen, um eine feine Verteilung zu erzielen. Das Volumen der Suspension wird auf ca. 800 cm^3 gebracht und das Globulin durch Zusatz eines gleichen Volums 10%iger Natriumchloridlösung in Lösung gebracht. Es

[1]) *Osborne*, Proteids of the Kidney bean. Journ. Amer. Chemical Society. XVI. pp. 633. 703. 757 (1894).

[2]) cf. *Osborne*, l. c. — *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of Phaseolin. Amer. Journ. of Physiol. XVIII. p. 295 (1907).

soll eine fast klare Lösung entstehen. Diese wird 4 Tage lang dialysiert und der gebildete Niederschlag nach obiger Beschreibung wieder gelöst. Die Lösung wird dann stehen gelassen, damit sich unlösliche Teile absetzen können. Dann wird, wenn nötig, nach C. 1 völlig klar filtriert.

Die klare Lösung wird 4 Tage lang dialysiert. Der gebildete Niederschlag absetzen gelassen und in einem *Büchner*schen Trichter auf einer Schicht gehärteten Papiers gesammelt. Das Phaseolin wird nach F. durch zweimalige Suspension in destilliertem Wasser gewaschen und auf einem *Büchner*schen Trichter so trocken wie möglich gesogen, hierauf mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol und zuletzt mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Das so zubereitete Phaseolin ist ein dichtes, schneeweißes Pulver. Nach der vorhergehenden Darstellungsmethode werden das leichter lösliche Phaselin und die Proteose aus dem Phaseolin entfernt.

b) Eigenschaften des Phaseolins.

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 52·66; H 6·94; N 15·84; S 0·34; O 24·22%.

Löslichkeit.[2]) Unlöslich in Wasser, löslich in sehr verdünnten Salzlösungen und in sehr verdünnten Säuren und Alkalien. In 10%iger Kochsalzlösung wird es durch geringe Mengen Essigsäure, Salzsäure, Salpetersäure und Schwefelsäure nicht gefällt, hingegen wird es mit Salzsäure aus 1%iger Natriumchloridlösung abgeschieden. In 10%iger Kochsalzlösung wird es durch Sättigung mit Natriumchlorid oder Magnesiumsulfat nur wenig gefällt.

Hitzekoagulation.[2]) In 10%iger Natriumchloridlösung erfolgt bei 95° Trübung, die bei steigender Temperatur langsam zunimmt. Nach einigem Erhitzen scheidet sich ein flockiges Koagulum ab, das aber selbst nach einstündigem Erhitzen geringfügig bleibt.

Spezifische Drehung.[3]) In 10%iger Kochsalzlösung ist $[\alpha]\frac{20^\circ}{D} =$ $= -41{\cdot}46^\circ$.

Fällung mit Ammonsulfat.[4]) In $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung beginnt die Fällung mit 6·5 cm^3 und ist vollständig mit 8·2 cm^3, wenn nach *Hofmeisters* Methode verfahren wird. Dies entspricht 57·3 und 77·3% wirklicher Sättigung.

---

[1]) *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of Phaseolin. Amer. Journ. of Physiol. XVIII. p. 295 (1907).

[2]) *Osborne*, The Proteids of the Kidney Bean. Journ. Amer. Chemical Society. XVI. pp. 633. 703. 757 (1894).

[3]) *Osborne* and *Harris*, The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[4]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits of some Vegetable Proteins with Ammonium Sulphate. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

Farbenreaktionen. Phaseolin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [1 u. 2]).

Stickstoffverteilung.[3]) N als NH_3 1·70; basischer N 3·62; nicht basischer N 10·20; N im MgO-Niederschlag 0·33%.

10. Glycinin aus Soyabohne (Glycine hispida).

Das hauptsächliche Protein der Soyabohne ist ein Globulin, das in Eigenschaften und Zusammensetzung dem Legumin sehr ähnlich ist. Es ist jedoch in mancher Hinsicht von allen anderen aus Leguminosen erhaltenen Proteinen verschieden und besitzt daher den Namen Glycinin.

Häufige fraktionierte Fällungen dieses Globulins ergaben Produkte von sehr konstanter elementarer Zusammensetzung.[4])

Neben Glycinin scheint die Soyabohne eine kleine Menge eines anderen, leichter löslichen Globulins zu enthalten, ferner etwas Legumelin und sehr wenig Proteose.

a) Darstellung von Glycinin.

Die Samen werden zunächst grob gemahlen, wobei ein großer Teil ihrer äußeren Samenhaut in großen Stücken entfernt wird. Diese werden größtenteils durch einen Luftstrom entfernt oder, indem man das zermahlene Material mit der Hand auf ein 8—10 *m* langes und ca. 1 *m* breites Tuch wirft. Hierbei werden die schwereren Stücke des Endosperms weiter geworfen als die leichten Samenhäute, so daß die letzteren sich zusammen mit kleineren Endospermstücken auf dem Tuch in der Nähe des Experimentators sammeln. Durch Wiederholung dieses Prozesses und darauf folgendes Sieben auf einem groben Sieb kann das meiste Endosperm frei von den äußeren Samenhäuten erhalten werden. Das Ganze wird dann etwas feiner gemahlen. Der Ölgehalt verhindert zunächst die Gewinnung eines feinen Mehls. Es wird zur Entfernung des größten Teiles des Öles mit Petroläther extrahiert und nun nach Befreiung von anhaftendem Petroläther so fein als möglich gemahlen.

1 *kg* feines Mehl wird mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung gemischt und der Auszug nach C. 3 filtriert. Das filtrierte Extrakt, das im durchfallenden Lichte völlig klar sein muß, ist im reflektierten Lichte stark opaleszent. Es wird 4 Tage lang nach D. 2 dialysiert. Das gefällte Globulin wird vom Dialysator entfernt, absetzen gelassen, die überstehende Flüssigkeit abgehebert und die Fällung auf einer Papierschicht in einem

[1]) *E. Abderhalden* und *B. Babkin*, Die Monoaminosäuren des Legumins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XLVII. p. 354 (1906).

[2]) *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of Phaseolin. Amer. Journ. of Physiol. XVIII. p. 295 (1907).

[3]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[4]) *Osborne* and *Campbell*, Proteids of the Soy-Bean (Glicine hispida). Journ. Amer. Chemical Society. XX. p. 419 (1898).

großen *Büchner*schen Trichter gesammelt und so trocken wie möglich gesogen.

Der Niederschlag wird dann vom Papier entfernt und durch ein Siebtuch in Wasser suspendiert. Die Klumpen, die sich auf dem Tuch sammeln, werden durchgespült, bis das Endvolumen 800—1000 cm^3 ist. Durch Zufügen eines gleichen Volums 20%iger Kochsalzlösung wird das Globulin praktisch vollständig gelöst. Die Lösung wird dann ohne Filtration, wie vorher, dialysiert. Das gefällte Glycinin wird in der eben beschriebenen Weise wieder gelöst. Wenn mehr als eine kleine Quantität unlöslicher Materie in der Lösung vorhanden ist, wird diese stehen gelassen, bis sich das Unlösliche abgesetzt hat. Die überstehende Flüssigkeit wird dann (C. 1) filtriert. Wenn so wenig unlösliches Material vorhanden ist, daß keine Gefahr besteht, daß es das Filter verstopft, wird die Lösung filtriert und die klare Lösung vier Tage lang dialysiert.

Das gefällte Glycinin wird dann, wie vorher, auf einem *Büchner*schen Trichter gesammelt, trocken gesogen, in destilliertem Wasser suspendiert (F.), absetzen gelassen, noch einmal abgesaugt und das Waschen wiederholt. Es wird dann in derselben Weise mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol gewaschen. Nach Waschen mit Äther wird das Glycinin in einem trockenen Luftstrom oder über Schwefelsäure getrocknet. Das so erhaltene Produkt stellt ein schneeweißes, feines Pulver dar.

Durch die wiederholten Fällungen mittelst Dialyse wird die kleine Menge löslichen Globulins entfernt, ebenso sämtliches Legumelin und die Proteose.

b) *Eigenschaften des Glycinins.*

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 52·12; H 6·93; N 17·53; S 0·79; O 22·63%.

Löslichkeit.[1]) Obgleich Wasser allein über 16% Glycinin aus dem Mehl der Soyabohne entfernt, ist das auf beschriebene Weise zubereitete Glycinin in reinem Wasser unlöslich, aber leicht löslich in Kochsalzlösung, die mehr als 2% dieses Salzes enthält. Es ist auch in gesättigten Kochsalz- oder Magnesiumsulfatlösungen löslich.

Hitzekoagulation.[1]) In 10%iger Kochsalzlösung wird Glycinin auch bei längerem Sieden nicht koaguliert.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat. Die Fällungsgrenzen mit diesem Salz sind nicht genau bestimmt worden. Der Kochsalzauszug der Soyabohne gibt einen reichlichen Niederschlag, wenn er mit diesem Salz $^6/_{10}$ gesättigt wird, aber es kann keine wohl definierte Grenze beobachtet werden, die für Glycinin eine obere Fällungsgrenze anzeigt.

Farbenreaktionen. Glycinin gibt alle gebräuchlichen Farbenreaktionen der Proteine.

[1]) *Osborne* and *Campbell*, Proteids of the Soy-Bean. Journ. Amer. Chemical Society. XX. p. 419 (1898).

Gehalt an Aminosäuren: vgl.[1])

Stickstoffverteilung.[2]) N als NH_3 2·11; basischer N 3·95; nicht basischer N 11·27; N im MgO-Niederschlag 0·12%.

11. Vignin aus Kuherbse (Vigna sinensis).

Der größte Teil der Proteine dieses Samens besteht aus einem Globulin, welches ebenfalls ähnlich, jedoch nicht identisch mit dem Legumin ist. Da die fraktionierte Fällung dieses Proteins eine Anzahl aufeinander folgender Fraktionen von konstanter elementarer Zusammensetzung und gleichen Eigenschaften ergeben hat und da kein Anhaltspunkt dafür vorhanden ist, daß es aus einer Mischung von zwei oder mehreren verschiedenen Proteinen besteht, ist es Vignin genannt worden.[3])

Neben Vignin enthält der Auszug aus der Kuherbse eine kleine Menge eines anderen leichter löslichen Globulins, das dem Phaseolin in Zusammensetzung und Eigenschaften sehr ähnlich ist. Ferner ist ein anderes Protein vorhanden, das dem Legumelin aus anderen Leguminosensamen gleicht.

a) Darstellung des Vignins.

Die Samen der Kuherbse werden grob gemahlen und der größere Teil der äußeren Samenhäute in der bei der Soyabohne beschriebenen Weise entfernt. Der Rest der äußeren Samenhäute wird durch allmähliches Zerkleinern und Sieben A. 1 abgeschieden. Das Mehl wird zu einem feinen Pulver zermahlen. Es ist nicht nötig, das Öl aus diesem Mehl zu entfernen.

1 *kg* feines Mehl wird mit 4 *l* 5%iger Natriumchloridlösung gemischt und der Auszug gemäß C. 3 filtriert. Dann wird das klare Extrakt drei Tage lang dialysiert, D. 2, der Inhalt des Dialysators entfernt und stehen gelassen, bis sich das Globulin abgesetzt hat. Die Lösung wird dann so vollständig, wie möglich, abgehebert und das Globulin in Wasser suspendiert, nachdem die Klumpen durch ein Siebtuch zerkleinert worden sind. Das Ganze wird dann auf ein Volumen von 1 *l* gebracht und 50 *g* Kochsalz darin aufgelöst. Die resultierende Lösung wird dann völlig klar filtriert (C. 1) und das Filter mit 5%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Das klare Filtrat und das Waschwasser werden mit vier Volumen destilliertem Wasser verdünnt, wobei die Konzentration des Kochsalzes auf 1% reduziert wird.

Da Vignin in 1%iger Kochsalzlösung nur wenig löslich ist, während die anderen Proteine der Kuherbse darin leicht löslich sind, wird das Vignin so ausgefällt und von dem weitaus größten Teil der übrigen Substanzen getrennt.

---

[1]) *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of Glycinin. Amer. Journ. Physiology. XIX. p. 468 (1907).

[2]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[3]) *Osborne*, The Proteids of the Cow Pea. Journ. Amer. Chemical Society. XIX. p. 494 (1897).

Nachdem sich das Vignin abgesetzt hat, wird die überstehende Flüssigkeit abgehebert und der Niederschlag auf gehärteten Filtern gesammelt. Der von der Lösung befreite Niederschlag wird in Wasser suspendiert, durch ein Siebtuch gegossen und das Volumen der Suspension auf 1 *l* gebracht. 50 *g* Kochsalz werden dann in der Suspension aufgelöst und die resultierende Lösung völlig klar filtriert (C. 1) und vier Tage lang dialysiert.

Der Inhalt des Dialysators wird dann in einen Topf gebracht und der Niederschlag absitzen gelassen. Die Lösung wird abgehebert, die Fällung auf eine gehärtete Papierschicht in einen *Büchner*schen Trichter gebracht, möglichst trocken gesogen, dann durch Suspension in Wasser gewaschen, durch ein Siebtuch gepreßt und auf dem *Büchner*schen Trichter abermals trocken gesogen. Nachher wird auf analoge Weise sukzessive mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol gewaschen, der Niederschlag mit Äther extrahiert und in einem trockenen Luftstrom oder über Schwefelsäure in einem Exsikkator getrocknet.

Das resultierende Produkt ist ein dichtes, farbloses Pulver, das 45 bis 50 *g* wiegt.

b) Eigenschaften des Vignins.

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 52·64; H 6·95; N 17·25; S 0·50; O 22·66%.

Löslichkeit.[1]) In Abwesenheit von Salzen löst sich Vignin in reinem Wasser in bedeutendem Maße. Zusatz von wenig Kochsalz zu dieser Lösung fällt das Vignin, das durch weiteren Salzzusatz völlig gelöst wird. In 10%iger Natriumchloridlösung braucht es zur Fällung des Vignins weniger Salzsäure als beim Phaseolin, aber mehr als beim Legumin. Eine verhältnismäßig große Quantität Essigsäure fällt das Vignin, während Phaseolin durch diese Säure gar nicht gefällt wird. Vignin ist löslich in gesättigten Natriumchlorid- oder Magnesiumsulfatlösungen.

Hitzekoagulation.[1]) In 10%iger Kochsalzlösung entsteht beim Erhitzen auf 98° eine Trübung. Nach fortgesetztem Erhitzen auf dem Wasserbad gesteht die Lösung zu einer Gallerte.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammoniumsulfat. Das mit $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung extrahierte Vignin fällt erst, wenn die Lösung zu 80% mit Ammonsulfat gesättigt ist. Genauere Bestimmungen der Fällungsgrenzen sind nicht gemacht worden.

Farbenreaktionen. Vignin gibt alle üblichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl.[2])

---

[1]) *Osborne* and *Campbell,* The Proteids of the Cow Pea. Journ. Amer. Chemical Society. XIX. p. 494 (1897).

[2]) *Osborne* and *Heyl,* Hydrolysis of Vignin. Amer. Journ. of Physiology. XXII. p. 362 (1908).

Stickstoffverteilung.[1]) N als NH_3 1·91; basischer N 4·28; nicht basischer N 10·81; N im MgO-Niederschlag 0·25%.

12. Conglutin aus Lupinensamen (Lupinus).

Die Samen der verschiedenen Lupinenarten (Lupinus) enthalten eine große Quantität eines Proteins, dem durch *Ritthausen* der Name Conglutin erteilt wurde. Nur ein unbedeutender Anteil des Proteins der gelben oder blauen Lupine ist wasserlöslich, 10%ige Kochsalzlösung aber extrahiert beinahe sämtliches Protein.[1]) Das so extrahierte Protein ist die als Conglutin bekannte Substanz. Weitgehende Fraktionierung des Conglutins der gelben Lupine zeigte, daß es eine Mischung zweier Globuline von verschiedener relativer Löslichkeit und verschiedener Zusammensetzung ist.[2 u. 3]) Diese seien vorläufig als Conglutin-α und Conglutin-β bezeichnet.

Das Globulin der blauen Lupine gleicht betreffs Zusammensetzung und Eigenschaften dem weniger löslichen und häufigeren Conglutin-α der gelben Lupine, es ist aber bis jetzt noch nicht genügend fraktioniert worden, um mit genügender Sicherheit als Conglutin-α bezeichnet zu werden.

Das rohe Globulin der gelben Lupine kann aus Kochsalzlösungen durch fraktionierte Fällung oder durch fraktionierte Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat in die beiden oben erwähnten Teile getrennt werden. Das weniger lösliche Globulin wird durch Ammonsulfat leichter gefällt als das leichter lösliche Globulin. Durch diese Methode kann eine bessere Trennung erzielt werden als durch fraktionierte Fällung aus Kochsalzlösungen. Blaue und gelbe Lupinen geben große Quantitäten rohen Globulins, aber die Trennung in die beiden Komponenten bedingt große Arbeit und Verlust von beinahe der Hälfte der Substanz. Es ist nicht klar, wodurch dieser Verlust verursacht wird. Es ist möglich, daß proteolytische Fermente diese schnellen Umwandlungen des Proteins bewirken. Dies kann auch die Gegenwart der leichter löslichen Fraktionen erklären.

a) Darstellung des Conglutins aus der gelben Lupine.

Die Samen werden grob gemahlen und die meisten Samenhüllen durch ein grobes Sieb entfernt. Der Rückstand wird dann fein zermahlen und der größere Teil der zurückbleibenden Hüllen durch Sieben entfernt. Das feine Mehl wird nun mit 92—94%igem Alkohol koliert, bis alles darin Lösliche entfernt ist. Nachdem der Überschuß des Alkohols auf einem *Büchner*schen Trichter abgesaugt ist, wird der Rückstand auf einer feinen Schicht ausgebreitet, bis der anhaftende Alkohol verdampft ist.

Man behandelt 1 *kg* Mehl mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung und mit so viel gesättigter Barytlösung, bis das Extrakt gegen Lackmus neutral

[1]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[2]) *Osborne* and *Campbell*, Proteins of Lupine Seeds. Journ. Amer. Chemical Society. XIX. p. 454 (1897).

[3]) *Osborne* and *Harris*, Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins (Second Paper). Amer. Journ. of Physiol. XIII. p. 436 (1905).

reagiert. Das Ganze wird dann auf eine Anzahl große Faltenfilter (*Schleicher-Schüll* Nr. 580) gebracht und ablaufen gelassen. Nach 4 Stunden hat man ungefähr 3500 *cm*³ klares Filtrat. Der Rückstand mit den Filtern wird ausgepreßt und der Preßsaft nach C. 1 klar filtriert. Das Volumen des filtrierten Extraktes beträgt ungefähr 80% des angewandten Lösungsmittels.

Der klare Extrakt wird dann 4 Tage lang dialysiert, wobei fast sämtliches Globulin gefällt wird. Der Inhalt des Dialysators wird hierauf in Töpfe gegossen und stehen gelassen, bis sich beinahe alle feste Substanz abgesetzt hat. Die trübe Lösung wird nunmehr von der halbflüssigen Fällung dekantiert. Zu der dekantierten Lösung wird so lange 2%ige Salzsäure zugefügt, als hierdurch eine Fällung verursacht wird. Die Substanz, die beim Stehen sich absetzt, wird zur Hauptmenge gefügt. Das Conglutin wird gewaschen, indem man es in 1 *l* Wasser suspendiert und aufrührt, bis es eine Emulsion bildet. Beim allmählichen Zusatz von 35 *cm*³ 2%iger Salzsäure scheidet es sich als flockiger Niederschlag ab, der sich bald als halbflüssige Masse absetzt und die überstehende Flüssigkeit beinahe klar läßt. Die Lösung wird dekantiert und mit noch etwas mehr 2%iger Salzsäure behandelt. Wenn sich beim Stehen noch mehr Substanz abscheidet, kann diese zur Hauptportion hinzugegeben werden. Die letztere wird noch einmal mit Wasser aufgerührt und nach dem Absetzen und Dekantieren mit ungefähr 1 *l* Alkohol durchgerührt. Dann wird auf einem *Büchner*schen Trichter, der mit einer Schicht gehärteten Filtrierpapiers versehen ist, filtriert, der Rückstand mit absolutem Alkohol entwässert, noch einmal abgesaugt und an der Luft getrocknet. So zubereitet wiegt das rohe Conglutin ungefähr 200 *g* und bildet ein blaßgelbes, dichtes Pulver, das in Salzlösungen leicht und vollständig löslich ist.

Um es in Conglutin-α und Conglutin-β zu trennen, wird es in 2 *l* $^1/_{10}$ gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst und so viel Ammonsulfatkristalle zugefügt, bis die Lösung $^{55}/_{100}$ völliger Sättigung erreicht. Der gefällte Niederschlag wird auf gehärtetem Filtrierpapier abfiltriert und das Filtrat auf $^{65}/_{100}$ gesättigt. Das Filtrat dieses zweiten Niederschlages wird dann völlig mit Ammonsulfat gesättigt und die Fällung auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt.

Der erste Niederschlag besteht aus beinahe reinem Conglutin-α, der zweite aus Conglutin-β. Diese beiden Niederschläge werden dann, wie oben geschildert, getrennt und wiedergefällt. Nach Wiederholung des Prozesses ist die Trennung praktisch vollständig.[1]) Jedes Produkt wird dann für sich in Kochsalzlösung gelöst, die Lösung, wenn nötig, filtriert und dialysiert, bis alles Conglutin gefällt ist. Die Niederschläge werden nun auf gehärtetem Filter gesammelt, mit Wasser und Alkohol gewaschen, mit absolutem Alkohol digeriert und über Schwefelsäure getrocknet.

---

[1]) *Osborne* and *Harris*, The Precipation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins (Second Paper). Amer. Journ. of Physiol. XIII. p. 436 (1905).

b) Eigenschaften des „Conglutin-α“.

Elementare Zusammensetzung.[2 u. 6]) C 51·75; H 6·96; N 17·57; S 0·62; O 23·10%.

Löslichkeit.[2]) Unlöslich in Wasser, hingegen leicht löslich in 5- bis 10%igen Natriumchloridlösungen. Conglutin zeigt weder nach Behandlung mit Alkohol noch nach dem Trocknen das Bestreben, in Salzlösungen unlöslich zu werden. In dieser Hinsicht zeigt es einen ausgesprochenen Gegensatz zu anderen Samenglobulinen. Conglutin-α ist in gesättigten Kochsalz- und Magnesiumsulfatlösungen löslich.

Hitzekoagulation.[2]) Eine 5%ige Lösung von Conglutin-α in 10%iger Kochsalzlösung zeigt beim Erhitzen auf 100° keine merkliche Veränderung, ausgenommen, daß sich nach einiger Zeit auf der Oberfläche eine durchscheinende Haut bildet. Beim Kühlen gesteht die Lösung zu einer Gallerte.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat.[1 u. 6]) In einer $^1/_{10}$ gesättigten Ammonsulfatlösung beginnt Fällung mit 4·2 *cm*³. Sie ist praktisch vollständig mit 7·0 *cm*³ (*Hofmeisters* Methode), d. h. die Fällung liegt zwischen 34 und 63% wirklicher Sättigung.

Farbenreaktionen. Conglutin gibt alle gewöhnlichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl.[3 u. 4])

Stickstoffverteilung.[5]) N als NH_3 2·12; basischer N 5·20; nicht basischer N 10·38; N im MgO-Niederschlag 0·18.

c) Eigenschaften des „Conglutin-β“.

Elementare Zusammensetzung.[2 u. 6]) C 49·91; H 6·81; N 18·40; S 1·67; O 23·21%.

Löslichkeit.[2]) Unlöslich in Wasser, aber leichter löslich in verdünnten Kochsalzlösungen als Conglutin-α. Es ist viel mehr Salzsäure oder Essigsäure nötig, um in Lösungen von Conglutin-β eine Fällung hervorzurufen, als es bei Conglutin-α der Fall ist. Löslich in gesättigter Natriumchlorid- oder Magnesiumsulfatlösung.

---

[1]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[2]) *Osborne* and *Campbell*, The Proteine of Lupine Seeds. Journ. Amer. Chemical Society. XIX. p. 454 (1897).

[3]) *Abderhalden* und *Herrick*, Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Conglutins aus Samen von Lupinus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XLV. p. 479 (1905).

[4]) *Osborne, Leavenworth* and *Brautlecht*, The Different Forms of Nitrogen in Proteins. Amer. Journ. of Physiol. XXIII. p. 180 (1908).

[5]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[6]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Second Paper. Amer. Journ. of Physiol. XIII. p. 436 (1905).

Hitzekoagulation.[1]) 5% Conglutin-β, gelöst in 10%iger Kochsalzlösung, wird bei 94° trübe. Nach langem Erhitzen auf 99° wird ein gelatinöses Koagulum abgeschieden.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammoniumsulfat.[2 u. 3]) Da Conglutin-α und Conglutin-β nebeneinander vorkommen und da die obere Grenze der Fällbarkeit des ersteren nahe der des letzteren ist, ist keine bestimmte untere Grenze für Conglutin-β festgestellt worden. Es wird meist über 7 cm^3 nach *Hofmeisters* Bestimmungsmethode oder über 64% wirklicher Sättigung gefällt.

Stickstoffverteilung.[4]) N als NH_3 2·65; basischer N 5·13; nicht basischer N 10·30; N im MgO-Niederschlag 0·14.

d) Darstellung des Conglutins aus der blauen Lupine.

Die Darstellung des rohen Conglutins aus der blauen Lupine wird in derselben Weise geleitet, wie bei der gelben Lupine. Die Ausbeute bei der blauen Lupine ist etwas geringer als bei der gelben Art. Da der Verfasser bis jetzt keine Erfahrung mit der fraktionierten Fällung des Conglutins der blauen Lupine durch Ammonsulfat besitzt, so kann er keine Angaben über diesen Prozeß machen. Aus demselben Grunde gibt er keine bestimmte Feststellungen über Präparate aus anderen Lupinenvarietäten.

II. Prolamine.

1. Gliadin aus Weizen (Triticum vulgare) und Roggen (Secale cereale).

Gliadin bildet ungefähr die Hälfte der Eiweißsubstanz des Weizensamens (Triticum vulgare) und bildet, zusammen mit einer ungefähr gleichen Menge Glutenin, den größeren Teil des Glutens (Kleber), welcher durch Waschen mit Wasser aus Weizenmehl erhalten werden kann. Das Endosperm des Samens enthält das Gliadin, das daher am besten aus Weizenmehl erhalten wird, von dem die anderen Samenteile völlig entfernt sind, was durch die üblichen Prozesse bei seiner Darstellung geschieht. Die Gliadinmenge variiert stark in verschiedenen Weizensorten, aber das Verhältnis des Gliadins zu den anderen Proteinen ist beinahe dasselbe. Der Gliadingehalt ist daher dem Stickstoffgehalt des Samens nahezu proportional.

Gliadin zeichnet sich von anderen Proteinen durch seine leichte Löslichkeit in Alkohol von 70—80% aus. Obgleich Gliadin in absolutem Alkohol

[1]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 837 (1903).

[2]) *Osborne* and *Harris*, The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Second Paper. Amer. Journ. of Physiol. XIII. p. 436 (1905).

[3]) *Osborne* and *Campbell*, The Proteine of Lupine Seeds. Journ. Amer. Chemical Society. XIX. p. 454 (1897).

[4]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

völlig unlöslich ist und sich in Wasser nur wenig löst, löst es sich leicht in Mischungen dieser beiden Flüssigkeiten. Der Löslichkeitsgrad wechselt mit dem relativen Verhältnis von Alkohol und Wasser, er nimmt bis zu einem gewissen Maximum bei Zufügung von Wasser zum Alkohol zu und dann ab. Das optimale Verhältnis von Alkohol und Wasser wurde nie bestimmt, doch liegt es nicht weit von 70% Alkohol; über 90% oder unter 50 Volumprozent wird nur wenig Gliadin gelöst. Neutrale Salzlösungen lösen nur wenig Gliadin, aber Wasser, das freie Säuren oder Alkalien enthält, löst es leicht.

Von mehreren Forschern ist bezweifelt worden, ob Gliadin das einzige alkohollösliche Weizenprotein ist. Die meisten von ihnen, die neuerdings diese Frage studiert haben, glauben, daß nur ein solches Protein im Weizensamen vorkommt. Auch des Verfassers ausgedehnte Untersuchung dieser Frage spricht nicht für das Vorkommen eines weiteren Proteins im alkoholischen Extrakt. Die Unterschiede der Löslichkeit in verschieden starkem Alkohol und die Unterschiede in der Zusammensetzung, die *Ritthausen* die Gegenwart von Glutenfibrin und von Mucedin vermuten ließen, sind zweifellos verursacht durch die Bildung verschiedener Gliadinsalze mit aus dem Samen extrahierten Säuren und durch Verunreinigungen der Präparate mit verschiedenen, nicht eiweißartigen Substanzen. Das hier unter dem Namen Gliadin beschriebene Protein stellt daher sämtliches mit Alkohol aus dem Weizensamen extrahierbare Protein dar.

a) Darstellung des Gliadins aus Weizenmehl.

Gliadin wird entweder dargestellt durch direkte Extraktion des Mehles mit 70%igem Alkohol oder durch Extraktion des durch Wasser aus dem Mehl gewaschenen Weizenklebers. In jedem Fall wird ein stickstoffreiches Mehl die beste Ausbeute geben.

Vier gleiche Portionen Mehl werden mit 70%igem Alkohol extrahiert, indem man den Auszug der ersten Portion zum Mehl der zweiten fügt und den Prozeß fortführt, bis das Extrakt in Berührung mit mindestens vier Portionen frischen Mehles gewesen ist. Die extrahierten Rückstände werden auf ähnliche Weise sukzessive gewaschen, bis jeder mit den Extrakten der vorausgegangenen Extraktionen und zuletzt mit 70%igem Alkohol behandelt worden ist.

Die für jede Portion nötige Menge Alkohol beträgt ungefähr das fünffache Gewicht des Mehles und die Extraktion jeder Portion wird am besten über Nacht ausgedehnt. Auf diese Weise kann jeden Tag ein einheitliches Extraktquantum gewonnen werden, ohne daß zu viel Zeit verwendet werden muß. So kann eine starke Gliadinlösung erhalten werden, welche, wie unter C. 1 beschrieben ist, vollständig klar durch eine Schicht von Papierbrei filtriert werden muß.

Der klare Auszug wird unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von 70° konzentriert. Die Konzentration und die weitere Behandlung kann gleichzeitig mit der Extraktion vorgenommen werden. Wenn die Kon-

zentration so weit vorgeschritten ist, daß die Lösung des Gliadins trübe wird und zu schäumen beginnt, müssen neue Portionen von Extrakt oder starkem Alkohol zugefügt werden, um das Gliadin wieder in Lösung zu bringen. Es muß während dieser Konzentration Sorge getragen werden, daß das Gliadin in Lösung bleibt, und daß die Temperatur des Wasserbades nicht über 70° steigt, denn bei zu langem oder zu hohem Erhitzen mit verdünntem Alkohol koaguliert das Gliadin.

Wenn sämtliche Auszüge zu einem dicken Sirup konzentriert sind, gießt man ihn unter konstantem Umrühren in einem feinen Strom in das sechs- oder achtfache Volumen eiskalten destillierten Wassers, dem man zur völligen Abscheidung des Gliadins einige Gramm Kochsalz zufügt. Nachdem sich das Gliadin in zusammenhängender Schicht abgeschieden hat, wird die wässerige Lösung so vollständig als möglich dekantiert, der Niederschlag zur Entfernung anhaftender Lösung oberflächlich mit Wasser gewaschen und dann durch Zugabe einer geringen Menge starken Alkohols in Lösung gebracht. Wenn das vom Gliadin zurückbehaltene Wasser nicht genügt, um Lösung zu bewirken, muß noch etwas Wasser zugefügt werden. Diese Lösung wird dann unter vermindertem Druck zu einem Sirup konzentriert und das Gliadin auf die eben beschriebene Weise durch Eingießen in Wasser noch einmal gefällt. Durch diese Behandlung werden die wasserlöslichen Kohlehydrate, Salze und andere wasserlösliche Proteine vom Gliadin getrennt.

Das Gliadin wird noch einmal in der oben beschriebenen Weise in Alkohol gelöst und die Lösung zu einem dicken Sirup konzentriert, indem man von Zeit zu Zeit Alkohol zufügt, um die Menge des Wassers auf eine Quantität zurückzuführen, die eben genügt, um das Gliadin in Lösung zu halten. Der Sirup wird dann in feinem Strom unter konstantem Rühren in das acht- bis zehnfache Volumen sehr starken Alkohols gegossen, wobei das Gliadin als zähe Masse gefällt wird, deren größter Teil in einem Klumpen am rührenden Glasstab hängt.

Das so gefällte Gliadin wird am besten unter absolutem Alkohol in kleine Stücke zerteilt und dann mit absolutem Alkohol digeriert, bis es in eine leicht zerreibliche Masse übergeführt ist. Der Alkohol wird dann durch schnelles Filtrieren unter Vermeidung von Luftfeuchtigkeit entfernt und das Gliadin mit trockenem Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Beim Trocknen in gewöhnlicher Zimmerluft nimmt das mit absolutem Alkohol imprägnierte Gliadin Feuchtigkeit auf und wird zähe, so daß schließlich eine hornartige Masse resultiert, die nicht leicht zerrieben werden kann. Wenn jedoch das Gliadin in der beschriebenen Weise vom Alkohol befreit wird, kann es nach dem Trocknen leicht zu einem feinen Pulver zerrieben werden.

b) Darstellung von Gliadin aus Weizengluten.

Um das Gliadin aus Weizenkleber darzustellen, wird das Mehl mit so viel Wasser gemischt, daß es einen zusammenhängenden Teig bildet und

in einem langsamen Strom von Wasser so lange gewaschen, bis die Stärke fast völlig entfernt ist. Das zurückbleibende Gluten wird, noch feucht, in möglichst kleine Stücke zerteilt. Um aus großen Quantitäten von Gluten verhältnismäßig kleine Stücke zu erhalten, ist es am besten, das Gluten durch die unter A. 2 *b* beschriebene Fruchtpresse durchzupressen. Das zerteilte Gluten wird dann gewogen und sein Wassergehalt als zwei Drittel des Gesamtgewichts des feuchten Glutens bestimmt. 200 *cm*³ 92%igen Alkohols werden für je 100% anwesenden Wassers zugefügt und das Gluten unter häufigem Umrühren während 24 Stunden digeriert. Besser ist es, wenn man die ungelöste Masse mit der Hand durcharbeitet und durchknetet.

Das Gluten wird dann auf ein Tuch abgegossen und durch Druck so weit wie möglich von der anhaftenden Lösung befreit. Es wird dann wieder so lange mit 70%igem Alkohol extrahiert, als eine genügende Menge Gliadin in Lösung geht. Das so erhaltene Extrakt wird völlig klar filtriert und in gleicher Weise, wie bei der direkten Extraktion des Mehles, mit Alkohol behandelt. Da die wasserlöslichen Bestandteile des Mehles beinahe vollständig durch Auswaschen des Glutens entfernt sind, genügt eine einmalige Fällung des Gliadins durch Ausgießen seiner konzentrierten alkoholischen Lösung in ein großes Volumen Wasser, um die geringe Menge wasserlöslicher Bestandteile, die der Auszug enthalten kann, zu entfernen.

c) Darstellung des Gliadins aus Roggen.

Das alkohollösliche Protein des Roggens ist dem des Weizens so ähnlich, daß bis jetzt keine genügenden Unterschiede entdeckt werden konnten, die eine Unterscheidung der beiden Proteine rechtfertigen würden. Ihre Identität ist jedoch auch noch nicht erwiesen. Da Roggenmehl kein zusammenhaftendes Gluten bildet, ist es notwendig, das Gliadin aus diesem Samen durch direkte Extraktion zu gewinnen. Das Gliadin ist daher aus Roggenmehl in derselben Weise dargestellt worden, wie es für die direkte Extraktion aus Weizenmehl beschrieben wurde.

d) Eigenschaften des Gliadins.

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 52·72; H 6·86; N 17·66; S 1·03; O 21·73%.

Löslichkeit.[1]) Das nach der beschriebenen Methode dargestellte Gliadin ist gewöhnlich nur in geringem Maße wasserlöslich, in Wasser, das anorganische Salze enthält, ist es noch weniger löslich. In absolutem Alkohol ist es gänzlich unlöslich, aber in Mischungen von Alkohol und Wasser ist es bis zu dem Verhältnis von ca. 70vol.%igem Alkohol und 30% Wasser zunehmend löslich. In verdünnten Lösungen von Ätzalkalien ist Gliadin leicht

---

[1]) *Osborne* and *Vorhees*, The Proteids of the Wheat Kernel. Amer. Chem. Journ. XV. p. 392 (1893).

löslich und fällt aus solchen Lösungen durch Kohlensäure oder Natriumbikarbonat. Gliadin ist auch in verdünnten Säuren löslich. In Äther, Chloroform, Benzin und beinahe allen wasserfreien Lösungsmitteln ist es ganz unlöslich.

Hitzekoagulation.[1]) Gliadin wird auch durch lange dauerndes Sieden seiner Lösung in 70%igem Alkohol nicht verändert. In Wasser oder in sehr verdünntem Alkohol wird es durch Sieden koaguliert.

Spezifische Drehung.[2]) Gelöst in 80vol.%igem Alkohol ist $[\alpha]_D^{20^0} = -92{\cdot}3^0$ [2]).

Farbenreaktionen: Gliadin gibt sämtliche gewöhnlichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [3, 4 u. 5])

Stickstoffverteilung.[6]) N als NH_3 4·33; basischer N 0·98; nicht basischer N 12·21; N im MgO-Niederschlag 0·14%.

2. Hordein aus Gerste (Hordeum vulgare).

Hordein macht 3—4% des Mehles aus. Neben Hordein enthält dieser Same, wie der des Weizens, eine kleine Menge Albumin, Globulin und Proteose, die zusammen etwa 1% des Samens bilden. Neben diesen Proteinen enthält das Gerstenmehl wahrscheinlich noch andere Eiweißstoffe, denn nach der Extraktion obiger Proteine bleibt noch im ungelösten Rückstand des Mehles eine beträchtliche Quantität Stickstoff, von dem ein Teil durch verdünntes Alkali extrahiert und durch verdünnte Säuren gefällt werden kann.

Da das Gerstenmehl viel Gummi enthält, der in verdünnten, alkalischen Lösungen auch löslich ist, gelang es bis jetzt nicht, Präparate dieses in neutralen Lösungen unlöslichen Proteins zu erhalten, die für weiteres Studium geeignet wären. Es ist daher nichts Bestimmtes über das Restprotein dieses Samens bekannt. Es ist jedoch nicht unwahrscheinlich, daß diese unbekannte Proteinsubstanz dem Weizen-Glutenin ähnlich ist.

a) Darstellung von Hordein.

Die Gewinnung des Hordeins erfolgt in genau derselben Weise, wie die Darstellung des mit 70%igem Alkohol aus dem Weizenmehl extrahierten Gliadins (s. S. 321).

[1]) *Osborne* and *Voorhees*, The Proteids of the Wheat Kernel. Amer. Chem. Journ. XV. p. 392 (1883).

[2]) *Osborne* and *Harris*, The Specific Rotation of Some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[3]) *Abderhalden* und *Samuely*, Die Zusammensetzung des „Gliadins" aus Weizenmehl. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XLIV. S. 276 (1905).

[4]) *Kossel* and *Kutscher*, ibid. XXXI. p. 165 (1900).

[5]) *Osborne* and *Clapp*, The Chemistry of the Protein Bodies of the Wheat Kernel. Part III. Amer. Journ. of Physiol. XVII. p. 231 (1906).

[6]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

b) *Eigenschaften des Hordeins.*

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 54·29; H 6·80; N 17·21; S 0·83; O 20·87%.

Löslichkeit.[1]) Das nach der eben beschriebenen Methode dargestellte Hordein ist in Wasser wenig löslich und gibt Lösungen, die durch Zusatz von Kochsalz gefällt werden. Die gelöste Menge ist sehr klein und die Löslichkeit in Wasser scheint etwas geringer zu sein, als die des Gliadins. In verdünntem Alkohol verschiedener Konzentration löst sich Hordein in ungefähr gleichem Maße wie Gliadin. In sehr verdünnten Lösungen von Säuren oder Ätzalkalien ist das Hordein leicht löslich und wird durch Neutralisation gefällt, ohne seine Löslichkeit in Alkohol zu verlieren.

Hitzekoagulation.[1]) Hordein wird durch Kochen der 70%igen alkoholischen Lösung nicht verändert, beim Erhitzen mit Wasser oder mit verdünntem Alkohol wird es koaguliert.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Farbenreaktionen. Hordein gibt alle gewöhnlichen Reaktionen der Proteine, möglicherweise mit Ausnahme von *Molisch*' Reaktion. Da Hordein mit Schwefelsäure allein eine starke rote Färbung gibt, die beim Zufügen von α-Naphtol anscheinend nicht geändert wird, ist es schwierig zu entscheiden, ob es die Molischreaktion gibt oder nicht.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [2 u. 3])

Stickstoffverteilung.[4]) N als NH_3 4·01; basischer N 0·77; nicht basischer N 12·04, N im MgO-Niederschlag 0·23.

3. Zein aus Mais (Zea Mays).

Zein ist das hauptsächliche Protein der Maissamen, von denen es ungefähr 5% ausmacht. Es ist charakterisiert durch seine bedeutende Löslichkeit in verhältnismäßig starkem Alkohol, obgleich es in absolutem Alkohol oder in Wasser völlig unlöslich ist. Aus verdünntem Alkohol wird Zein gefällt, wenn das Verhältnis von Wasser zu Alkohol in der Lösung einen bestimmten Wert erreicht hat.

In alkoholischer Lösung erleidet das Zein eine langsame Umwandlung, indem konzentrierte Lösungen, die zuerst ganz flüssig waren, nach einigen Tagen durchsichtige Gallerten bilden, die bei längerem Stehen härter werden. Nachdem diese Umwandlung vor sich gegangen ist, kann das Zein

---

[1]) *Osborne*, The Proteids of Barley. Journ. Amer. Chemical Society. XVII. p. 539 (1895).

[2]) *Osborne* and *Clapp*, Hydrolysis of Hordein. Amer. Journ. of Physiol. XIX. p. 117 (1907).

[3]) *Kleinschmitt*, Hydrolyse des Hordeins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. LIV. S. 276 (1907).

[4]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

nicht wieder in Alkohol gelöst werden, und es ist wichtig, alkoholische Lösungen von Zein nicht mehrere Tage stehen zu lassen, da bei nur geringfügigem Auftreten dieser Umwandlung es praktisch unmöglich ist, die Lösung zu filtrieren.

a) Darstellung des Zeins.

Zein wird am besten aus fein gemahlenem weißen Mais dargestellt, denn der Farbstoff der gelben Varietäten, der in Alkohol leicht löslich ist, kann aus den Präparaten nicht völlig entfernt werden. Zein wird auch in großen Quantitäten aus dem stickstoffhaltigen Nebenprodukt der Mais-Stärkefabrikation erhalten, denn das sogenannte „Gluten“ enthält eine große Menge dieses Proteins. Die beste Ausbeute wird aus dem „Gluten“ erhalten, wenn es noch feucht ist oder aus dem bei niedriger Temperatur getrockneten. Der fein zermahlene Samen oder das „Gluten“ wird mit 80—90%igem Alkohol in der beim Gliadin (S. 321) beschriebenen Weise extrahiert. Das filtrierte Extrakt wird unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen gebracht, wobei man durch Zufügen von starkem Alkohol Sorge trägt, daß keine Koagulation erfolgt. Die konzentrierte Lösung wird dann in das 8—10fache Volumen Wasser, das etwas Natriumchlorid enthält, gegossen, und das Zein als flockiger Niederschlag, der sich bald zu einer dichten, zusammenhängenden Masse vereinigt, ausgefällt.

Nach dem Dekantieren der Lösung wird das Zein in kleine Stücke zerteilt und durch Schütteln mit 90—95%igem Alkohol in einer verschlossenen Flasche aufgelöst. Die konzentrierte Lösung wird dann, so lange als Fett entfernt wird, in einem Scheidetrichter mit Petroläther geschüttelt und darauf, wenn nötig, vollständig klar filtriert (C. 1) und das Zein durch Eingießen in ein Gemisch von 2 Volumen Alkohol und 1 Volumen Äther gefällt. Wenn sich das Zein nicht aus dem Alkoholäthergemisch ausscheidet, muß eine ganz geringe Menge in Alkohol gelöstes Ammonacetat zugefügt werden. Da rohes Zein eine verhältnismäßig große Menge Fett und in Äther lösliche Substanzen enthält, ist für deren Entfernung eine gründliche Behandlung seiner Lösung mit Petroläther und Fällen mit Äther-Alkohol notwendig. Auf diese Weise werden Fette und Farbstoffe leichter und vollständiger entfernt als durch Extraktion des isolierten Zeins mit Äther. Um daher von ätherlöslichen Substanzen vollständig freie Lösungen zu erzielen, ist es wichtig, die Fällung mit Äther-Alkohol so lange zu wiederholen, bis die Lösung keine ätherlöslichen Substanzen mehr enthält.

Wenn das Zein von Fett befreit ist, wird es in einer kleinen Menge starken Alkohols gelöst, und diese Lösung in einem feinen Strom in ein großes Volumen destillierten Wassers, das geringe Mengen Natriumchlorid enthält, gegossen. Das gefällte Zein wird dann mit der Hand, in kleine Stücke zerteilt, auf einer passenden Fläche ausgebreitet und an der Luft trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wird das Produkt gemahlen und in einer Flasche bis zum Gebrauch verschlossen aufbewahrt.

Auf diese Weise aus weißem Mais dargestellt, bildet das Zein eine schneeweiße Substanz, die ohne große Schwierigkeit zu einem Pulver

zerrieben werden kann. Aus gelbem Mais bereitet, zeigt das Produkt eine gelbe Färbung.

b) *Eigenschaften des Zeins.*

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 53·23; H 7·26; N 16·13; S 0·60; O 20·78%.

Löslichkeit.[2]) Zein ist in Wasser und in absolutem Alkohol unlöslich. In käuflichem Alkohol von 90—92% ist es leicht löslich und solche Lösungen können zu einem Sirup konzentriert und selbst zur Trockene verdampft werden, ohne daß sich Zein aus der Lösung abscheidet. Das Zein, das beim Eindampfen dieser Lösungen zurückbleibt, bildet einen durchsichtigen Film von beträchtlicher Zähigkeit und Biegsamkeit. Verdünnterer Alkohol löst Zein in gleicher Weise, aber bei der Konzentration solcher Lösungen scheidet sich das Zein als eine opake plastische Masse ab. Alkohol von weniger als 50% löst nur wenig Zein. In $^2/_{10}$%iger Kalihydratlösung ist Zein leicht löslich und wird durch Neutralisation unverändert wieder gefällt. In $^5/_{10}$%iger Natriumkarbonatlösung oder $^2/_{10}$%iger Salzsäure ist Zein selbst beim Erwärmen auf 40° unlöslich.

Hitzekoagulation. Durch fortgesetztes Sieden mit Wasser oder sehr verdünntem Alkohol wird Zein allmählich koaguliert und in Alkohol unlöslich.

Spezifische Drehung.[3]) In 90%igem Alkohol ist $[\alpha]\frac{20^0}{D} = -28^0$.

Farbenreaktionen. Zein gibt die üblichen Farbenreaktionen der Proteine, ausgenommen die Molischreaktion und die Reaktion für Tryptophan.

Gehalt an Aminosäuren: vgl.[4])

Stickstoffverteilung.[5]) N als NH_3 2·97; basischer N 0·49; nicht basischer N 12·51; N im MgO-Niederschlag 0·16%.

III. Gluteline.

Glutenin aus Weizen (Triticum vulgare).

Glutenin macht ungefähr die Hälfte der Eiweißsubstanz des Weizens aus und bildet zusammen mit dem Gliadin beinahe das ganze durch Auswaschen des Weizenmehles mit Wasser erhaltene Gluten. Glutenin kommt

---

[1]) *Chittenden* and *Osborne,* A Study of the Proteids of the Corn or Maize Kernel. Amer. Chemical Journ. XIII. p. 453. 529 (1891) und XIV. p. 20 (1892).

[2]) *Osborne,* The Amount and Properties of the Proteids of the Maize Kernel. Journ. Amer. Chemical Society. XIX. p. 525 (1897).

[3]) *Osborne* and *Harris,* The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 842 (1903).

[4]) *Osborne* and *Clapp,* Hydrolysis of the Proteins of Maize. Amer. Journ. of Physiology. XX. p. 477 (1908).

[5]) *Osborne* and *Harris,* Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

im Endosperm der Samen vor und kann daher aus dem käuflichen Weizenmehl erhalten werden. Wie beim Gliadin variiert die Menge des Glutenins stark bei den verschiedenen Weizenvarietäten und ist am größten in den stickstoffreichsten.

Glutenin ist das in Wasser, Salzlösungen und Alkohol unlösliche Weizenprotein. Es kann nur in verdünnten, kaustischen Alkalien oder Säuren gelöst werden.

Obgleich Glutenin und Gliadin dieselbe elementare Zusammensetzung haben, sind sie doch deutlich verschiedene Proteine, wie das Resultat der totalen Hydrolyse beider Eiweißarten deutlich zeigt.

a) Darstellung von Glutenin.

Glutenin wird am besten aus Gluten dargestellt, so daß der Glutenrückstand, der nach der Alkoholextraktion des Gliadins hinterbleibt, für diesen Zweck gebraucht werden kann. (S. 321.)

Nach der Extraktion des fein zerteilten Glutens mit Alkohol bis zur völligen Entfernung sämtlichen Gliadins wird der ungelöste Rückstand bei Zimmertemperatur getrocknet und möglichst fein gemahlen. Das resultierende Pulver wird mit Alkohol und Äther so lange extrahiert, als etwas gelöst wird. Der Alkohol wird dann bei Zimmertemperatur verdampft und das zurückbleibende Pulver mit soviel $^2/_{10}$%iger Kalihydroxydlösung behandelt, als zur Lösung nötig ist. Die erhaltene trübe Lösung wird dann auf einem Breifilter, wie unter C. 1, filtriert und, wenn die Lösung vollständig klar ist, mit sehr verdünnter Salzsäure neutralisiert. Der Niederschlag wird dann mit 70%igem Alkohol so lange, als Gliadin in Lösung geht, extrahiert. Dann wird nochmals in einer möglichst geringen Menge $^2/_{10}$%iger Kalihydroxydlösung gelöst, die Lösung, wenn nötig, klar filtriert und noch einmal mit sehr verdünnter Salzsäure gefällt. Nachdem man, um sich von der vollständigen Wegnahme sämtlichen Gliadins zu überzeugen, wieder mit 70%igem Alkohol extrahiert hat, wird das Glutenin vollständig mit absolutem Alkohol entwässert, mit Äther extrahiert und über Schwefelsäure getrocknet. Wenn die alkalische Lösung, aus der das Glutenin gefällt wird, nicht völlig klar ist, so ist das erhaltene Produkt nicht rein und enthält weniger Stickstoff und mehr Kohlenstoff, als in völlig gereinigten Gluteninpräparaten gefunden wird.

Das so gewonnene Glutenin ist ein weißes, voluminöses Pulver.

b) Eigenschaften des Glutenins.

Elementare Zusammensetzung.[1]) C 52·34; H 6·83; N 17·49; S 1·08; O 22·26%.

Löslichkeit.[1]) Glutenin ist in kaltem Wasser oder in kaltem verdünnten Alkohol praktisch unlöslich. Bei der Behandlung mit warmem Wasser oder

[1]) *Osborne* and *Voorhees*, The Proteids of the Wheat Kernel. Amer. Chemical Journ. XV. p. 392 (1893).

mit warmem Alkohol löst sich jedoch eine sehr geringe Menge, die sich beim Abkühlen wieder abscheidet. In sehr verdünnten Lösungen von kaustischen Alkalien oder Säuren ist Glutenin leicht löslich und wird bei Neutralisation bis zur ganz schwachen, sauren Reaktion mit unveränderten Eigenschaften wieder gefällt.

Hitzekoagulation. In siedendem Wasser koaguliert Glutenin und wird in sehr verdünnten Säuren oder Alkalien unlöslich.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Farbenreaktionen. Glutenin gibt sämtliche bekannten Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl.[1, 2 u. 3]).

Stickstoffverteilung.[4]) N als NH_3 3·30; basischer N 2·05; nicht basischer N 11·95; N im MgO-Niederschlag 0·19%.

IV. Albumine.

1. Leukosin aus Gerste (Hordeum vulgare), Roggen (Secale cereale), Weizen (Triticum vulgare).

Im Gersten-, Roggen- und Weizensamen sind ungefähr 0·4% Albumin, Leukosin, vorhanden. Die elementare Zusammensetzung und die Eigenschaften des Leukosins von jedem dieser Samen sind dieselben.[5]) Das aus diesen Samen erhaltene einzige andere wasserlösliche Protein ist eine sehr geringe Menge von Proteose, von der das Leukosin getrennt wird, indem man den Auszug bei ca. 65° koaguliert.

Da Leukosin einen so geringen Teil der ganzen Körner bildet, ist es kaum empfehlenswert, große Quantitäten direkt aus den Samen darzustellen. Da aber der ölfreie Embryo des Weizens ungefähr 10% Leukosin enthält, so lassen sich verhältnismäßig große Mengen schnell aus den käuflichen „Weizenkeimen", die bei der Darstellung des Weizenmehles gewonnen werden, gewinnen. Dieses aus Mühlen zu erhaltende Produkt besteht zum größten Teil aus dem Embryo, enthält aber auch ein wenig Endosperm und Kleie. Da diese Embryonen zwischen Rollen in dünne Schuppen verwandelt worden sind, ist es nicht nötig, feiner zu mahlen, um eine gute Ausbeute an Leukosin zu erhalten. Auch ist die Entfernung des Öles nicht erforderlich.

Der Weizenembryo enthält auch eine große Menge von Nukleinsäure, die sich bei der Extraktion mit Wasser teilweise zusammen mit dem Leu-

---

[1]) *Osborne* and *Clapp,* The Chemistry of the Protein Bodies of the Wheat Kernel. Amer. Journ. of Physiol. XVII. p. 231 (1906).

[2]) *Abderhalden* und *Malengreau,* Die Monoaminosäuren des Glutens. Zeitschr. f. physiol. Chemie. XLVIII. p. 514 (1906).

[3]) *Kossel* und *Kutscher,* Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Ibid. XXXI. p. 165 (1900).

[4]) *Osborne* and *Harris,* Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[5]) cf. *Osborne,* The Proteids of Barley. Journ. Amer. Chemical Society. XVII. p. 539 (1895).

kosin löst. Wenn der wässerige Auszug des Embryos sofort durch Erhitzen koaguliert wird, scheidet sich eine beträchtliche Menge Nukleinsäure im Verein mit dem koagulierten Leukosin ab. Wenn jedoch das Leukosin durch Halbsättigung mit Ammonsulfat zuerst gefällt und der Niederschlag umgelöst wird, bleibt die Nukleinsäure mit einem Teil des Leukosins im unlöslichen Rückstand und das Hitzekoagulum, das nachher aus den filtrierten Lösungen erhalten wird, ist entweder ganz oder beinahe phosphorfrei.

Nach des Verfassers Ansicht wird die auf diese Weise aus dem Embryo gelöste Nukleinsäure als Proteinsalz gelöst, eine organische Bindung zwischen Nukleinsäure und Protein existiert nicht im wässerigen Extrakt.[1])

a) *Darstellung von koaguliertem Leukosin.*

Ein Gewichtsteil Embryomehl wird mit vier Gewichtsteilen Wasser behandelt, indem man durch Umrühren das Wasser mit dem Mehl in innige Berührung bringt. Das Ganze wird ungefähr eine Stunde stehen gelassen, so daß sich das unlösliche Material absetzen und zusammenballen kann.

Das Extrakt wird dann durch ein feinmaschiges Tuch filtriert. Dies geschieht, indem man das Tuch über ein grobes Sieb legt, das man auf ein passendes Gefäß setzt, um die durchgehende Flüssigkeit zu sammeln. Nachdem viel Lösung durchgelaufen ist, wird ein Teil der rückständigen Lösung abgeschieden, indem man das Tuch sachte derart vom Sieb nimmt, daß der Rückstand vor und rückwärts über die Oberfläche gleitet und zuletzt so weit von der Lösung befreit wird, daß er in der Presse ausgedrückt werden kann.

Da der so erhaltene trübe Auszug schleimig ist und nicht leicht filtriert werden kann, werden so viele Ammonsulfatkristalle zugegeben, bis das Extrakt halbgesättigt und das gelöste Leukosin zusammen mit den im Extrakt suspendierten unlöslichen Stoffen gefällt wird. Dieser Niederschlag wird dann auf gehärteten Faltenfiltern filtriert, mit einer reichlichen Menge Wasser behandelt (E. 1), und die Lösung in der unter C. 3 beschriebenen Weise völlig klar filtriert.

Der klare Auszug wird dann in einem Wasserbad auf 65° erhitzt, bis sich das koagulierte Leukosin in großen Flocken aus der klar zurückbleibenden Lösung abscheidet. Das Koagulum wird auf Faltenfilter abfiltriert, tüchtig mit heißem Wasser gewaschen, mit absolutem Alkohol wasserfrei gemacht und mit trockenem Äther extrahiert. Das auf diese Weise gewonnene koagulierte Leukosin bildet ein leichtes farbloses Pulver.

b) *Eigenschaften des koagulierten Leukosins.*

Elementare Zusammensetzung.[2]) C 53·0; H 6·8; N 16·8; S 1·3; O 22·1%.

[1]) cf. *Osborne* and *Campbell*, The Nucleic Acid of the Embryo of Wheat and its Proteid Campounds. Journ. Amer. Chemical Society. XXII. p. 379 (1900).

[2]) *Osborne*, The Proteids of Barley. Journ. Amer. Chemical Society. XVII. p. 539 (1895).

Löslichkeit.[1]) Das koagulierte Leukosin ist unlöslich in Wasser und in genügend verdünnten Säuren und Alkalien. Das unkoagulierte Leukosin ist löslich in Wasser und in sauren oder alkalischen Lösungen. Die wässerige Lösung wird jedoch durch Sättigung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat gefällt.

Hitzekoagulation.[1]) Leukosin scheidet sich aus seinen wässerigen Lösungen beim langsamen Erhitzen auf 52° als flockiger Niederschlag ab, bei rascherem Erhitzen erfolgt die Abscheidung bei höherer Temperatur. Vollständige Koagulation wird nur schwierig bewirkt. Um eine praktisch vollständige Abscheidung herbeizuführen, ist längeres Erhitzen auf 65° nötig. Zusatz von Kochsalz fördert die Abscheidung des Koagulums. Wird das wässerige Extrakt während einiger Zeit auf 65° erhitzt, vom koagulierten Leukosin filtriert und auf 75° erhitzt, so wird eine sehr kleine Menge Koagulum erhalten. Dieses ist vielleicht ein anderes Albumin, doch kann es auch der Rest des bei der niedrigen Temperatur nicht koagulierten Leukosins sein.

Fällung mit Ammonsulfat. Unkoaguliertes Leukosin wird bei halber Sättigung mit diesem Salz gefällt, d. h. durch Lösen von 38 *g* Ammonsulfat in 100 cm^3 der Lösung.

Farbenreaktionen. Leukosin gibt sämtliche Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl.[2])

Stickstoffverteilung.[3]) N als NH_3 1·16; N als basischer N 3·50; nicht basischer N 11·83; N im MgO-Niederschlag 0·43%.

2. *Ricin aus der Ricinusbohne (Ricinus communis).*

Es war schon lange bekannt, daß die Samen der Ricinusölpflanze (Ricinus communis) eine sehr giftige Substanz enthalten, die zusammen mit den Proteinsubstanzen extrahiert und abgeschieden werden kann. Die gewöhnlichen Präparate vom sogenannten Ricin bestehen aus einer Mischung verschiedener Proteine zusammen mit mehr oder weniger von der toxischen Substanz. Eine sorgfältige und weitgehende Fraktionierung der Ricinusproteine hat gezeigt[4]), daß der größere Teil des Proteins dieses Samens keine toxische Wirkung hat und daher sorgfältig entfernt werden sollte bei der Darstellung von Ricinpräparaten hoher Giftigkeit. Die Proteine der Ricinusbohne bestehen aus einem Globulin, das durch Dialyse leicht gefällt wird, aus einem oder mehreren Albuminen, die unter 80° koagulierbar sind, und aus einer verhältnismäßig großen Menge Proteosen.

---

[1]) *Osborne,* The Proteids of Barley, Journ. Amer. Chemical Society. XVII. p. 539. (1895).

[2]) *Osborne* and *Clapp,* Chemistry of the Protein Bodies of the Wheat Kernel. Part III. Amer. Journ. of Physiol. XVII. p. 231 (1906).

[3]) *Osborne* and *Harris,* Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

[4]) *Osborne, Mendel* and *Harris,* A Study of the Proteins of the Castor-bean with Especial Reference to the Isolation of Ricin. Amer. Journ. of Physiol. XIV. p. 259 (1905).

Die dem Ricin eigentümlichen toxischen Eigenschaften finden sich nur in den Proteinpräparaten der Ricinusbohne, welche das Albumin enthalten, und es ist sehr wahrscheinlich, daß die Toxizität eine Eigenschaft des Albumins ist, obgleich die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß die toxischen Eigenschaften einer nicht eiweißartigen Substanz zukommen, die unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen mit dem Albumin verbunden ist oder gefällt wird. Die enorme Giftigkeit der so dargestellten Ricinpräparate und die Bedingungen, unter denen sie erhalten werden, machen jedoch diese letztere Annahme unwahrscheinlich.

Die Ricinpräparate bestehen aus einer Mischung von ungefähr 70% koagulierbarem Albumin und 30% Proteose. Ob die letztere ein wesentlicher Bestandteil oder eine Beimischung ist, bedarf weiterer Untersuchung. Die Ricinpräparate zeigen alle charakteristischen Eigenschaften wahrer Proteinsubstanzen.

a) Darstellung von Ricin.

Die Samen von Ricinus communis var. zanzibarensis, eine kultivierte Varietät von stattlicher Größe, werden zertrümmert und vom größten Teil des Öles nach A. 2 *b* befreit und der Rest des Öles mit Äther extrahiert. Es ist nicht nötig, die Samenschalen zu entfernen.

Nach feinem Zermahlen des ölfreien Mehles wird 1 *kg* mit 4600 cm^3 10%iger Kochsalzlösung extrahiert und der Auszug durch Filterbrei völlig klar filtriert und nach D. 2 vier Tage in fließendem Wasser dialysiert. Das gefällte Globulin wird auf gehärteten Faltenfiltern abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat und die Waschwasser werden auf 11 500 cm^3 gebracht. Darin werden 5050 *g* Ammonsulfat gelöst, was annähernd 45% völliger Sättigung mit diesem Salz entspricht.

Der Niederschlag wird auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert und in einem *Büchner*schen Trichter so trocken als möglich gesogen, dann in einem Liter Wasser gelöst und 500 cm^3 einer gesättigten Ammonsulfatlösung zugefügt. Der resultierende Niederschlag wird auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert und in 250 cm^3 Wasser gelöst. Seine Lösungen werden hierauf 11 Tage lang dialysiert.

Der Niederschlag, der sich bei der Dialyse bildet, wird abfiltriert und das Filtrat in einer niederen Schale mit flachem Boden in einem trockenen Luftstrom von nicht über 50° verdunstet. Das Filtrat des vorhin erwähnten Niederschlages mit Ammonsulfatlösung wird mit 500 cm^3 gesättigter Ammonsulfatlösung weiter behandelt und der gebildete Niederschlag in Wasser 11 Tage dialysiert. Nach dem Abfiltrieren von dem durch die Dialyse gebildeten Niederschlag wird dieses Filtrat auch bei 50° in einer flachen Schale verdunstet.

Die beiden Rückstände in den Schalen werden dann entfernt, indem man so viel Petroläther darüber gießt, daß sie völlig bedeckt sind und sie dann mit einem Spatel abkratzt. Der Petroläther wird zugefügt, um das äußerst giftige Ricin beim Abkratzen am Herumspritzen zu verhindern.

Dies kann man weiterhin verhüten, indem man gleichzeitig während des Abkratzens eine Glasscheibe über die Schale legt. Diese Operation muß im Freien ausgeführt werden, damit jede Möglichkeit des Verlustes von Partikeln im Laboratorium vermieden wird. Mit Hinsicht auf die große Giftigkeit des Ricins sind äußerste Vorsichtsmaßregeln gegen jede zufällige Vergiftung mit der Substanz zu treffen.

Wenn die Rückstände von den Schalen abgekratzt sind, werden sie mit Hilfe des Petroläthers in weithalsige Flaschen gegossen und der Petroläther bei niedriger Temperatur abgedunstet. Der Rückstand der ersten Schale wiegt ungefähr 12 *g*, der der zweiten ungefähr 20 *g* oder nahezu 2·5% des Samens.

b) Eigenschaften des Ricins.[1]

Elementare Zusammensetzung. Das giftigste bis jetzt erhaltene Ricinpräparat hatte folgende Zusammensetzung: C 52·01; H 7·02; N 16·56; S 1·29; P 0·00; O 23·12%.

Löslichkeit. Völlig löslich in reinem Wasser. Fällt durch Sättigung mit Magnesiumsulfat. Fällt mit Alkohol und wird hierdurch in Wasser mehr oder weniger in einem von der Konzentration und der Einwirkungszeit des Alkohols abhängigen Grade unlöslich.

Hitzekoagulation. Die Koagulationstemperatur hängt zum großen Teil von der Konzentration der Lösung und der Gegenwart von Salzen ab. Wässerige Lösungen geben bei langsamem Erhitzen bei 60—70° ein flockiges Koagulum. Das am meisten aktive Ricinpräparat ergab ca. 70% Koagulum und 30% Proteose. Die Giftigkeit der Ricinpräparate ist proportional ihrem Gehalte an koagulablem Albumin. Albuminfreie giftige Proteinfraktionen sind aus den Ricinussamen nicht erhalten worden.

Spezifische Drehung. In wässeriger Lösung ist $[\alpha]\frac{20^0}{D} = -28·85^0$.

Fällung mit Ammoniumsulfat. Fällt zwischen $^1/_5$ und $^2/_3$ Sättigung mit diesem Salz.

Farbenreaktionen. Ricin gibt alle gewöhnlichen Farbenreaktionen der Proteine.

Stickstoffverteilung. N als NH_3 1·74; basischer N 4·29; nicht basischer N 10·42%.

3. Legumelin aus Erbse (Pisum sativum), Linse (Ervum lens), Saubohne (Vicia faba), Wicke (Vicia sativa), Kuherbse (Vigna sinensis), Soyabohne (Glicine hispida).

Die Samen vieler Leguminosen enthalten eine nicht unbeträchtliche Menge Albumin. Die von verschiedenen Spezies erhaltenen Präparate haben dieselbe elementare Zusammensetzung und Koagulationstemperatur. Dieses Protein ist vorläufig Legumelin genannt worden. Es ist nicht entschieden

[1]) *Osborne, Mendel* and *Harris,* A Study of the Proteins of the Castor-bean with Especial Reference to the Isolation of Ricin. Amer. Journ. of Physiol. XIV. p. 259 (1905).

worden, ob Legumelin von verschiedenen Samen dieselbe Substanz ist. Es wurde weder bei Phaseolus noch bei Lupinus gefunden.

a) Darstellung von koaguliertem Legumelin.

Legumelin wird aus dem Kochsalzextrakt der Erbse, Linse, Saubohne, Wicke, Soyabohne und Kuherbse erhalten, nachdem diese durch andauernde Dialyse vollständig vom Globulin befreit worden sind. Die Methode für die Darstellung dieser Extrakte findet sich unter Legumin S. 305 ff.; Glycinin S. 313; Vignin S. 315.

Der vom Globulin befreite Auszug wird während 1 Stunde in einem Wasserbad auf 80° erwärmt. Das sich abscheidende Koagulum wird auf einem gehärteten Faltenfilter filtriert, vom Filter genommen und durch fein verteilte Suspension in heißem Wasser vollständig gewaschen, dann durch Suspension in einer großen Menge absoluten Alkohols entwässert. Nach dem Abfiltrieren des partiell entwässerten Legumelins wird es durch wiederholtes Reiben unter absolutem Alkohol zu einem Pulver zerrieben. Wenn es so von Wasser befreit ist, wird es über Schwefelsäure getrocknet.

Es bildet, so dargestellt, ein voluminöses, schneeweißes Pulver. Wenn es durch absoluten Alkohol nicht gut entwässert worden war, entsteht beim Trocknen eine zähe, hornartige Masse, die sehr schwierig zu zerreiben ist.

b) Eigenschaften des koagulierten Legumelins.

Elementare Zusammensetzung. C 53·3; H 6·9; N 16·2; S 1·1; O 22·5%.

Löslichkeit. Das durch Hitze koagulierte Legumelin ist im wasserhaltigen Zustand in verdünnten, kaustisch alkalischen Lösungen löslich, aber in sehr verdünnten Säuren unlöslich. Das nicht koagulierte Legumelin ist in reinem Wasser löslich, wird aber aus der wässerigen Lösung durch Zusatz von Essigsäure oder Salzsäure mit viel Kochsalz gefällt. Durch Sättigung mit Kochsalz allein oder mit Magnesiumsulfat wird es nicht gefällt.

Hitzekoagulation. Die Koagulationstemperatur hängt sehr von der Konzentration der Lösung und von der Menge des vorhandenen Salzes ab. Bei langsamem Erhitzen bildet sich gewöhnlich zwischen 55 und 60° ein flockiges Koagulum.

Farbenreaktionen. Legumelin gibt alle charakteristischen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: (Erbse) vgl.[1]).

Stickstoffverteilung (Erbse)[2]). N als NH_3 1·04; basischer N 3·45; nicht basischer N 11·33; N im MgO-Niederschlag 0·38%.

[1]) *Osborne* and *Heyl*, Hydrolysis of Coagulated Legumelin from the Pea. Journ. of biol. Chemistry. V. p. 197 (1908).

[2]) *Osborne* and *Harris*, Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chemical Society. XXV. p. 323 (1903).

B. Darstellung der Proteine der Tierwelt.

a) Gruppe der krystallisierbaren Eiweißstoffe.

Von **Fr. N. Schulz,** Jena.

Darstellung von kristallisiertem Eieralbumin aus Hühnereiern.

Das alte *Hofmeister*sche Verfahren [1]) besteht darin, daß nach Entfernung der Globuline durch Halbsättigung von Eierweiß mit Ammonsulfat durch spontanes Verdunsten von Wasser allmählich die Konzentration der erhaltenen Albuminlöung an Ammonsulfat bis zur unteren Fällungsgrenze des Eieralbumins gesteigert wird. *Hofmeister* benutzte dabei Eierweiß, das zunächst zu Schaum geschlagen und nach dem Zergehen des Schaums filtriert wird. Es erfolgt dann zunächst in der Regel die Ausscheidung des Eieralbumins in Form von Kugeln (Globulithen. Sphärolithen) oder von kugelförmigen Nadelaggregaten. Gelegentlich beobachtet man auch, daß schon bei der ersten Ausfällung isolierte Kristallnadeln auftreten. Diese beim ersten Ausfällen erhaltenen Niederschläge werden auf dem Filter gesammelt, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, dann in Wasser aufgelöst, mit dem gleichen Volum konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt. Dann wird wieder durch spontanes Verdunsten aus flachen Schalen die Kristallisation eingeleitet. Man erhält nunmehr Kristallniederschläge, die schon mehr oder weniger aus reinen Kristallnadeln ohne sichtbare Beimengungen bestehen. Bei mehrfachem Umkristallisieren werden die Nadeln immer kleiner und der Kristallbrei immer einheitlicher. Zur wirklichen Reindarstellung ist mehrfaches Umkristallisieren erforderlich, wie insbesondere aus den Beobachtungen von *Schulz* und *Zsigmondy* [2]) über die „Goldzahl" des kristallisierten Eieralbumins hervorgeht. Da wo es auf möglichste Reinheit des Präparates ankommt, ist es zweckmäßig, durch Feststellung der „Goldzahl" die Kontrolle auszuüben.

---

[1]) *Franz Hofmeister, a)* Über Darstellung von kristallisiertem Eieralbumin und die Kristallisierbarkeit kolloidaler Stoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **14**. S. 165—172 (1889); *b)* Über die Zusammensetzung des kristallinischen Eieralbumins. Ebenda. Bd. **16**. S. 187—199 (1891).

[2]) *Fr. N. Schulz* und *R. Zsigmondy,* Die Goldzahl und ihre Verwertbarkeit zur Charakterisierung von Eiweißstoffen. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 3. S. 137—160 (1902).

Da das alte *Hofmeister*sche Verfahren zeitraubend ist und nicht immer zu guten Kristallpräparaten führt, auch dann nicht, wenn man durch Ausimpfen von vorrätigen Kristallen einer früheren Darstellung die Kristallisationsbedingungen verbessert, so wird man sich in der Regel des „Säureverfahrens" bedienen.

Das „Säureverfahren" nach *Hopkins* und *Pinkus* [1]): Zur Benutzung gelangt das Eierklar von möglichst frischen Eiern. Bei Verwendung nicht frischer Eier, auch wenn dieselben nach Geruch und Geschmack einwandfrei erscheinen, hat man häufiger Mißerfolge *(M. Cohn).* [2])

Das vom Eigelb abgetrennte Eierklar kann man direkt mit dem gleichen Volum einer konzentrierten Lösung von reinem Ammoniumsulfat versetzen und dann nach gründlichem Durchmischen von dem ausgeschiedenen Globulinniederschlag abfiltrieren. Ich ziehe es vor, das Eierklar zunächst mit etwa 2 Volumina Wasser zu verdünnen und erst zu dieser verdünnten Eierklarlösung das gleiche Volum Ammoniumsulfat hinzuzugeben. Beim Versetzen des unverdünnten Eierklars mit Ammoniumsulfat macht die gründliche Durchmischung Schwierigkeiten, so daß leicht zähe Gallertmassen von Eierklar übrig bleiben, die sich erst schwer und langsam mit der übrigen Flüssigkeit durchtränken. Zur gleichmäßigen Ausfällung der Globuline ist aber eine vollständige Durchmischung notwendig. Nach vollständiger Vermengung filtriert man von dem Globulinniederschlag ab. Wenn man vor dem Abfiltrieren zunächst einige Zeit wartet, erleichtert man sich die Filtration. Mit dem Filtrat kann man nach *Hopkins* und *Pinkus* so verfahren, daß man zunächst konzentrierte Ammoniumsulfatlösung hinzugibt, bis eben ein deutlicher bleibender Niederschlag auftritt. Dann wird vorsichtig destilliertes Wasser hinzugefügt, bis der Niederschlag wieder verschwunden ist, und nunmehr mit 10%iger Essigsäure tropfenweise versetzt bis zur deutlichen bleibenden Ausscheidung. *Cohn* [2]) setzt die Essigsäure direkt zu dem globulinfreien Filtrat, das halb mit Ammoniumsulfat gesättigt ist. Man braucht dabei ca. 1·8—2 cm^3 pro 100 cm^3 Filtrat. *Krieger* [3]) benutzt zur Ausfällung statt der Essigsäure eine Schwefelsäure, die ca. $^1/_{10}$ normal und halb mit Ammoniumsulfat gesättigt ist. Das *Krieger*sche Verfahren ist zunächst für die Darstellung von Serumalbuminkristallen aus Pferdeblut angegeben, läßt sich aber, wie Verf. [4]) dartat, mit gleichem Erfolg auch auf das Eieralbumin anwenden. Auch Salzsäure läßt sich verwenden [*Osborne*]. [5]) Die Ausscheidung erfolgt

[1]) *F. G. Hopkins* und *S. N. Pinkus,* Bemerkungen über die Kristallisation tierischer Albuminstoffe. Journ. of physiol. Vol. **23**. p. 130—136 (1898).

[2]) *Michael Cohn,* Notiz zur Darstellung kristallinischer Eiweißstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **43**. S. 41—43 (1904).

[3]) *Hans Th. Krieger,* Über Darstellung kristallinischer tierischer Eiweißstoffe. Diss. Straßburg 1899.

[4]) *Fr. N. Schulz,* Über Oxydation von kristallisiertem Eiereiweiß mit Wasserstoffsuperoxyd. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 87—104 (1899).

[5]) *Th. B. Osborne,* Über Eieralbumin. Journ. Americ. Chem. Soc. Vol. **21**. p. 477 bis 485 (1899).

in Form von Kristalldrusen sowie von isolierten Kristallnadeln. Zum Umkristallisieren wird der auf dem Filter gesammelte Kristallbrei in Wasser gelöst und dann mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung bis zur beginnenden Fällung versetzt. Beim Umkristallisieren ist ein erneuter Säurezusatz nicht erforderlich. Auch hier verschwinden beim Umkristallisieren die Kristalldrusen, und es treten isoliert liegende Nadeln auf, die bei jedem Umkristallisieren in der Regel kleiner werden. Auch in diesem Fall kann die Goldzahl zur Feststellung der völligen Reinheit dienen.

Zur Erzielung großer Kristalle kann man sich mit Erfolg der Erhöhung der Konzentration durch spontane Verdunstung bedienen. Wenn man den bei der ersten Kristallisation erhaltenen Niederschlag in Wasser löst, die Lösung mit dem gleichen Volum konzentrierter Ammoniumsulfatlösung versetzt und dann die Mischung im Becherglas offen stehen läßt, so kann man mitunter Kristalle bekommen, die makroskopisch sichtbar sind.

Nach *Panormoff*[1]) soll auch das Taubenei einen Albuminstoff enthalten, der nach dem *Hofmeister*schen Verfahren kristallisiert, dasselbe gilt nach *Worms* für das Albumin des Eiweißes der Truthühnereier.[2])

Ob Natriumsulfat oder Ammoniumselenat, die zur Darstellung von Serumalbuminkristallen benutzt werden können, auch für Eieralbumin verwertbar sind, ist nicht untersucht.

Darstellung von kristallisiertem Serumalbumin aus Pferdeblutserum.

Die Methode der Darstellung ist ganz analog der der Eieralbuminkristalle. Ein Unterschied besteht nur darin, daß es Pferdesera gibt, die ganz besonders leicht kristallisiertes Albumin liefern. So hat *Gürber*[3]), der Entdecker dieser Kristalle, dieselben mehrfach in schönster Weise erhalten, indem er zu dem durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat globulinfrei gemachten Serum einfach konzentrierte Ammoniumsulfatlösung hinzugab bis zur beginnenden bleibenden Trübung. Man erhält dann in manchen Fällen schon in ganz kurzer Zeit (eine oder wenige Stunden) prächtig ausgebildete Kristalle (Fig. 36). In manchen Fällen versagt aber dieses einfache Verfahren; man ist dann genötigt, sich des Säureverfahrens nach *Hopkins* oder nach *Krieger* zu bedienen. *Krieger* hatte in 17 Versuchen keinen Mißerfolg, dagegen eine sehr wechselnde Ausbeute. *Inagakis*[4]) Untersuchungen be-

[1]) *A. A. Panormoff*, Über Eigenschaften eines der im Taubenei enthaltenen Albumine. Journ. d. russ. physiol.-chem. Gesellsch. Bd. **29**. S. 372 und S. 398—404 (1897).

[2]) *W. Worms*, Die Albumine des Eiweißes der Truthühnereier. Journ. d. russ. physiol.-chem. Gesellsch. Bd. **38**. S. 597—607 (1906).

[3]) *A. Gürber*, Kristallisation des Serumalbumins. Sitzungsber. d. Physiol.-med. Gesellsch. zu Würzburg 1894. Bd. **1**. S. 43—46; siehe auch *A. Michel*, Zur Kenntnis der *Gürber*schen Serumalbuminkristalle. Mit einem Nachwort von *A. Gürber*. Verhandl. d. Physiol.-med. Gesellsch. zu Würzburg. Bd. **29**. S. 117—144 (1895).

[4]) *C. Inagaki*, Zur Kenntnis der Eiweißkristallisation. Ebenda. Bd. **38**. S. 1—17 (1905).

stätigen diese Tatsache, daß im Pferdeserum das kristallisierende Albumin stets vorhanden ist. Nach den Angaben *Gürbers* kann man auch mit Natriumsulfat Serumalbuminkristalle erzeugen. *Inagaki* stellte solche mit Ammoniumselenat dar. Für besondere Fragen ist das von Wichtigkeit.

Zur Darstellung kann man defibriniertes Pferdeserum benutzen, oder aber auch das Plasma von durch Ammoniumoxalatzusatz (10% einer 1%igen Lösung) ungerinnbar gemachtem Pferdeblut. Die Ausbeute ist eine sehr wechselnde, auch ist der Grad der Reinheit der Kristallpräparate ein verschiedener. Namentlich bei Blut mit wenig kristallisierendem Albumin sind in der Regel amorphe Beimengungen vorhanden, die auch beim Umkristallisieren hartnäckig anhaften. Nach den Untersuchungen von *Inagaki* kommen für den Erfolg der Kristallisation zwei Momente in Betracht: erstens das Auftreten von Kristallisationshindernissen, welche durch geeigneten Säurezusatz bei der Kristallisation im wesentlichen beseitigt werden können, und zweitens der jeweilige Gehalt an kristallisierendem Eiweiß. Daß für die wechselnden Ausbeuten beim Säureverfahren, wobei also die Kristallisationshindernisse beseitigt sind, der wechselnde Gehalt an kristallisierendem Eiweiß verantwortlich ist, darauf schließt *Inagaki* aus der Beobachtung, daß nach der Kristallausbeute auch die Menge des Ammoniaks wechselt, welche bei der Ausfällung mit Ammoniumsulfat frei wird. Während nämlich bei der Fällung von nicht kristallisierendem Eiweiß mit Ammoniumsulfat kein Ammoniak in nennenswerten Mengen frei wird, entstehen bei der Fällung des kristallisierenden Albumins beträchtliche Mengen von Ammoniak, die, wie gesagt, zur Ausbeute an Kristallen in direkter Beziehung stehen. *Inagaki* schließt daraus, daß die Pferdeserumalbuminkristalle Verbindungen von Albumin mit Schwefelsäure (bzw. Selensäure) sind. Nach *Gürber* und *Michel* erhält man aus Pferdeserum Kristallfraktionen, die sich nicht nur in der Form, sondern namentlich auch in ihren Löslichkeitsverhältnissen bzw. Fällungsverhältnissen gegen Ammoniumsulfat von einander unterscheiden. Wie auch *Inagaki* glaubt, handelt es sich nach ihnen nicht um mehr oder weniger vollkommen ausgebildete Kristalle eines und desselben Körpers, sondern um verschiedene Körper (vielleicht um verschieden stark gesättigte Sulfate eines und desselben Albumins). Zur praktischen Verwertung eignet sich nur die in Fig. 36 abgebildete Kristallfraktion, die zuerst auftritt und auch an Masse

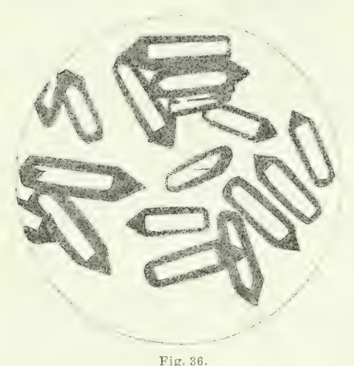


Fig. 36.
Serumalbuminkristalle aus Pferdeblut nach *Gürber*.

überwiegt. Aus anderen Blutarten, außer Pferdeblut, sind Albuminkristalle bisher mit Sicherheit nicht erhalten.

Benutzung der Kristalle von Eieralbumin bzw. Serumalbumin zur chemischen Untersuchung. Den Kristallpräparaten der besprochenen Albumine haftet die ammonsulfathaltige Mutterlauge an. Eine Entfernung dieser Mutterlauge ohne Aufhebung der Kristallnatur (die Form läßt sich bei vorsichtiger Koagulation durch Hitze oder durch Alkohol gelegentlich erhalten) ist nicht möglich. Zur Entfernung des Ammoniumsulfates kann man sich entweder der Dialyse oder des Auswaschens nach vorhergegangener Koagulation bedienen. Wenn es sich um die Gewinnung größerer Mengen handelt, bleibt nur der letztere Modus. Man löst den auf dem Filter gesammelten Kristallbrei in wenig Wasser und verfährt im übrigen nach den üblichen Regeln.

Darstellung von Blutfarbstoffkristallen.[1]

A. Darstellung von Oxyhämoglobin nach *Hoppe-Seyler.*[2]) Das Verfahren beruht auf einer kombinierten Anwendung von Alkohol und Kälte. Zu einer auf 0° abgekühlten Blutfarbstofflösung wird ebenfalls auf 0° abgekühlter Alkohol, und zwar $^{1}/_{4}$ Volum hinzugegeben und dann diese Mischung bei einer Temperatur von mindestens 0° (zweckmäßig jedoch möglichst kalt) gehalten. Es erfolgt dann je nach der Blutsorte in kürzerer oder längerer Zeit reichliche Kristallisation. *Hoppe-Seyler* benutzte zuerst einfach defibriniertes Blut und bewirkte die Auflösung der Blutkörperchen durch Zusatz des gleichen Volums destillierten Wassers. Bei der Kristallisation bestehen zwei Gefahren, einmal die Verunreinigung der Hämoglobin- (bzw. Oxyhämoglobin-)Kristalle durch anhaftende Serumeiweißstoffe, und zweitens durch anhaftende Stromata der roten Blutkörperchen. Die erstere Gefahr ist früher überschätzt worden, denn nach *Zinnoffsky*[3]) wird tatsächlich aus Blutserum mit Alkohol in der Kälte unter den Bedingungen, welche bei der Kristallisation des Blutfarbstoffes in Betracht kommen, kein Eiweiß ausgefällt. Da aber trotzdem beim Ausfällen des Oxyhämoglobins Eiweiß mitgerissen werden kann und auch mit der Mutterlauge anhaftet, so

[1]) Siehe die zusammenfassenden Darstellungen bei *a) Fr. N. Schulz,* Die Kristallisation von Eiweißstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweißchemie. Verlag Gustav Fischer, Jena 1901. 39 S. Sowie namentlich von *b) H. U. Kobert,* Das Wirbeltierblut in mikrokristallographischer Hinsicht. Verlag Enke, Stuttgart 1901. 118 S. mit 6 Abbildungen.

[2]) Die ersten Angaben über Darstellung von Blutfarbstoffkristallen mit dem Kältealkoholverfahren finden sich bei *F. Hoppe-Seyler,* Beiträge zur Kenntnis des Blutes des Menschen und der Wirbeltiere. Med.-chem. Unters. H. 2. S. 181—185 (1867). — Das Verfahren ist von *Hoppe-Seyler* mehrfach modifiziert, siehe die verschiedenen Auflagen des Handbuchs der physiolog.-chem. Analyse sowie dessen „Physiolog. Chemie". S. 372 bis 375 (1879).

[3]) *O. Zinnoffsky,* Über die Größe des Hämoglobinmoleküls. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **10**. S. 16—34 (1885).

ist es auf alle Fälle zweckmäßig, die Blutkörperchen vor dem Auflösen mit destilliertem Wasser wenigstens einmal mit isotonischer Kochsalzlösung auszuwaschen. Die weitere Schwierigkeit bei der Reindarstellung von Blutfarbstoffkristallen besteht in der Entfernung der Stromata, die nicht nur außen den Kristallen anhaften, sondern auch zum Teil in den Kristallen selbst eingeschlossen sind. *Hoppe-Seyler* hat zu diesem Zwecke empfohlen, die Blutfarbstofflösung mit reichlich Äther auszuschütteln. Stromata lassen sich dann mikroskopisch nicht mehr nachweisen. Statt Äther können auch andere indifferente Lipoidlösungsmittel, wie Chloroform, Benzin, in gleicher Weise verwandt werden. Bei Verwendung von Benzin soll die Kristallisation nach *Mayet*[1]) sogar besonders reichlich erfolgen. Im allgemeinen wird man aber gut tun, beim altbewährten Äther zu bleiben.

Zinnoffsky[2]) hat, einer mündlichen Mitteilung von *A. Schmidt* folgend, zur Lösung bzw. Aufquellung der Stromata eine verdünnte Ammoniaklösung

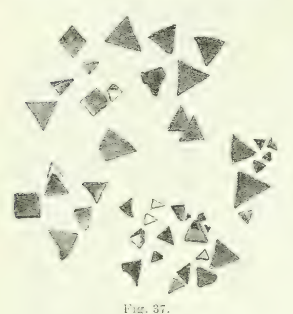


Fig. 37.
Oxyhämoglobinkristalle aus Meerschweinchenblut.

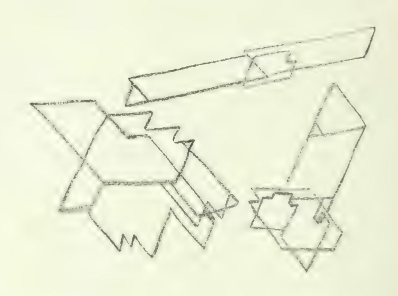


Fig. 38.
Oxyhämoglobinkristalle aus Pferdeblut.

empfohlen, die nachher mit verdünnter Salzsäure neutralisiert wird. Man riskiert dabei, daß das leicht zersetzbare Hämoglobin auch bei Verwendung ganz dünner Ammoniaklösungen angegriffen wird *(Hüfner)*.[3]) Auch durch Erzeugung indifferenter Niederschläge (z. B. mit Baryt) lassen sich die Stromata entfernen. Wesentliche Vorteile bieten diese Modifikationen nicht. Das Oxyhämoglobin der verschiedenen Blutarten zeigt ein sehr verschiedenes Kristallisationsvermögen, was zum Teil sicher in der verschiedenen Löslichkeit des Blutfarbstoffes beruht. Wegen der Kristallformen siehe Fig. 37—40. Dem kann man zum Teil begegnen, indem man je nach

[1]) *Mayet*, Verbesserung der Darstellung von kristallisiertem Hämoglobin nach *Hoppe-Seyler*, Neues Verfahren zur Darstellung dieses Körpers. Compt. rend. T. **109**. p. 156 bis 158 (1890).

[2]) *O. Zinnoffsky*, Über die Größe des Hämoglobinmoleküls. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **10**. S. 16—34 (1885).

[3]) *G. Hüfner*, Beitrag zur Lehre vom Blutfarbstoff. Festschr. f. *C. Ludwig*. 1887. S. 74—81 (1898).

der Blutart zum Auflösen der Blutkörperchen mehr oder weniger Wasser benutzt oder mit anderen Worten, indem man einmal mit verdünnten, das andere Mal mit konzentrierten Blutfarbstofflösungen arbeitet. Das Pferdebluthämoglobin rechnet zu den verhältnismäßig leicht kristallisierenden Blutsorten. Nach *Zinnoffsky* (l. c.[1]) soll man den Blutkörperchenbrei mit dem dreifachen Volum Wasser zur Auflösung bringen. *Abderhalden*[2]) nimmt dagegen nur das doppelte Volum und erhält dabei eine allerdings langsamere Kristallisation, aber besser ausgebildete Kristalle und sehr gute Ausbeute (ca. 80% der berechneten Menge). Auch für Hundeblut empfiehlt *Abderhalden*[3]), nur das doppelte Volum Wasser zum Auflösen der Blutkörperchen hinzuzugeben; Katzenoxyhämoglobin kristallisiert nach *Abderhalden*[3]) überhaupt nur, wenn man nicht mehr wie das gleiche Volum anwendet. Nach *Gescheideln*[4]) wird die Kristallisationsfähigkeit des Oxyhämo-

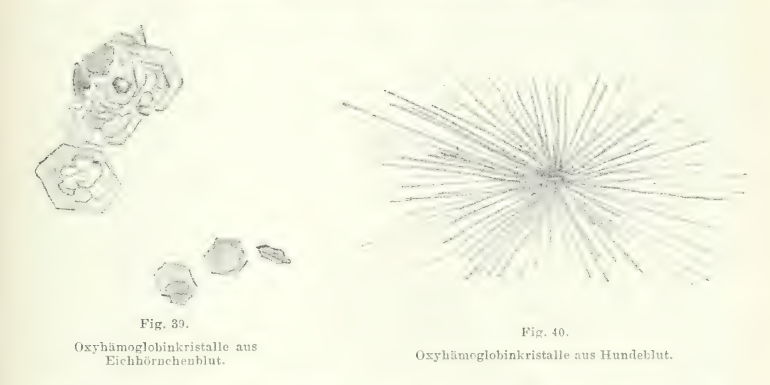


Fig. 39. Oxyhämoglobinkristalle aus Eichhörnchenblut.

Fig. 40. Oxyhämoglobinkristalle aus Hundeblut.

globins wesentlich erhöht, wenn man das Blut zunächst einer kurzen Fäulnis im Brutofen unterwirft.

Besondere Bedingungen bietet die Darstellung des Blutfarbstoffes des Vogelblutes sowie anderer Tiere mit kernhaltigen roten Blutkörperchen, vor allem wegen der hier in Betracht kommenden sekundären Blutgerinnung. Nach Ablauf der gewöhnlichen Blutgerinnung oder auch gleichzeitig mit derselben vollzieht sich namentlich bei Einwirkung chemisch differenter Stoffe, wozu auch 1%ige Kochsalzlösung gehört, eine Umwandlung von Eiweißstoffen der Blutkörperchen, die in ihrer äußeren Form

[1]) *O. Zinnoffsky*, Über die Größe des Hämoglobinmoleküls. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **10**. S. 16—34 (1885).

[2]) *E. Abderhalden*, Die Resorption des Eisens, sein Verhalten im Organismus und seine Ausscheidung. Zeitschr. f. Biol. Bd. **39**. S. 143 (1901).

[3]) *E. Abderhalden*, Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes im Katzenblut. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **24**. S. 545—547 (1898).

[4]) *Gescheideln*, Einfache Methode, Blutkristalle zu erzeugen. *Pflügers* Arch. Bd. **16**. S. 421—423 (1878).

manche Ähnlichkeit mit der echten Blutgerinnung hat. *Hoppe-Seyler*[1]) hat nach seiner Methode Oxyhämoglobin aus Gänseblut in zur Analyse ausreichender Menge kristallisiert erhalten. Er berichtet, daß auch aus Enten- und Taubenblut das Oxyhämoglobin ebenso leicht wie aus Gänseblut kristallisiere. Von Schwierigkeiten, die durch sekundäre Blutgerinnung bedingt werden, erwähnt er nichts. Er gibt an, daß das Blut der Gänse und anderer Vögel beim Behandeln der Blutkörperchen mit „Äther und etwas Wasser" eine tiefrote, völlig klare Flüssigkeit liefert. *Jaquet*[2]) stieß dagegen bei der Darstellung von Oxyhämoglobinkristallen aus Hühnerblut auf Schwierigkeiten. Beim Behandeln der Blutkörperchen mit Äther resultierte eine Gallerte, die sich nicht weiter verarbeiten ließ. Auch Verfasser hat gelegentlich die gleiche Beobachtung gemacht. Überhaupt haben die Blutkörperchen des Vogelblutes die Neigung zur Bildung von Gallerten, die den Farbstoff fest einschließen. Solche Gallerte erhält man z. B. beim Versuch, Blutkörperchenbrei des Gänseblutes mit 1%iger Kochsalzlösung oder auch stärkeren Kochsalzlösungen (z. B. 3%ige) auszuwaschen. So findet sich denn auch in der neuesten Auflage von *Hoppe-Seylers* physiol. u. patholog.-chem. Analyse[3]) die Angabe, daß beim Auswaschen der Blutkörperchen von Vogel-, Amphibien- oder Fischblut Natriumsulfatlösung statt Chlornatriumlösung zu verwenden sei. Eine genauere Erprobung der Darstellung von Vogelhämoglobin unter Verwendung von Natriumsulfat hat anscheinend nicht stattgefunden. *Jaquet* hat sich so geholfen, daß er die Gallerte, welche entstand, wenn er mit dem gleichen Volum Wasser verdünnten Blutkörperchenbrei des Vogelblutes mit $^1/_3$ Volum Äther schüttelte, auf 35° erwärmte; es schieden sich dann dicke Gallertklumpen ab, welche durch Zentrifugieren und Filtrieren von einer klaren, dunkelroten Farbstofflösung abgetrennt werden konnten. Reine Oxyhämoglobinkristalle aus Gänseblut haben neuerdings *Abderhalden* und *Medigreceanu* in größerer Menge dargestellt.[4])

Beim Blut der Seeschildkröte (Thalassochelys corticata) hat *Bardachzi*[5]) diese störenden Nachgerinnungen beseitigt, indem er den zentrifugierten Blutkörperchenbrei mit Wasser versetzte und dann einige Stunden auf 50° erwärmte. Dabei bilden sich derbe Gerinnsel, die durch Filtration von der Blutfarbstofflösung abgetrennt werden können. Mit dieser Lösung wird dann nach der *Hoppe-Seyler*schen Vorschrift verfahren.

B. Darstellung von Oxyhämoglobinkristallen nach dem Dialysationsverfahren. Da ein zu reichlicher Gehalt an Alkohol bei

[1]) *F. Hoppe-Seyler,* Beiträge zur Kenntnis des Blutes der Menschen und der Wirbeltiere. Med.-chem. Unters. II. Heft. S. 169—208 (1867).

[2]) *A. Jaquet,* Beiträge zur Kenntnis des Blutfarbstoffes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **14**. S. 289—296 (1889).

[3]) 7. Aufl., bearbeitet von *H. Thierfelder* (1903).

[4]) *Emil Abderhalden* und *Florentin Medigreceanu,* Beitrag zur Kenntnis des Oxyhämoglobins verschiedener Tierarten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **59**. S. 165 (1909).

[5]) *Franz Bardachzi,* Über den Blutfarbstoff der Thalassochelys corticata. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **49**. S. 465—471 (1906).

dem *Hoppe-Seyler*schen Verfahren durch partielle Koagulation des Oxyhämoglobins schädlich wirkt, so haben *Arthus* [1]) und unabhängig davon *H. Frey* [2]) vorgeschlagen, durch Dialyse der Blutfarbstofflösung gegen Alkohol den Alkohol allmählich zuzuführen und dann auch nur soviel wie zur Erzeugung der Kristalle unbedingt erforderlich ist. Dabei kann man auch die niedrigen Temperaturen, die beim *Hoppe-Seyler*schen Verfahren nötig sind, vermeiden oder wenigstens einschränken. Eine genauere Vorschrift zur Darstellung mittelst Dialyse findet man bei *Schuurmanns-Stekhoven.* [3]) Mit 1⁰/₀iger Kochsalzlösung auf der Zentrifuge gewaschene Blutkörperchen werden 2 Stunden mit Asbestflocken gründlich geschüttelt. Der Blutfarbstoff löst sich dann in der Salzlösung auf, indem die Stromata größtenteils an den Asbestflocken ankleben und so durch Filtration entfernt werden können. So kommt das Oxyhämoglobin gar nicht mit Äther in Berührung und man erhält eine sehr konzentrierte Farbstofflösung. Dann wird die Blutfarbstofflösung in einem Pergamentschlauch in 45⁰/₀ Alkohol in den Eisschrank gestellt. Sobald sich Oxyhämoglobinkristalle an der Dialysatorwand absetzen (nach 24—40 Stunden), wird der Dialysatorinhalt in ein zylindrisches Gefäß gebracht und darin im Eisschrank bis zum völligen Ablauf der Kristallisation belassen. Zum Umkristallisieren werden die abfiltrierten Kristalle bei 37⁰ in möglichst wenig Wasser gelöst und die Lösung wieder (im Eisschrank) gegen 45⁰/₀ Alkohol dialysiert. Dieses Dialysationsverfahren, das offenbare Vorteile bietet, ist bisher nur in vereinzelten Fällen praktisch benutzt worden. Elementaranalysen derartiger Kristallpräparate liegen überhaupt noch nicht vor.

C. Das Ammoniumsulfatverfahren. Für manche Blutarten läßt sich auch die Aussalzung mit Ammoniumsulfat zur Darstellung von Kristallpräparaten mit Vorteil benutzen. Man kann nach diesem Verfahren insbesondere aus Pferdeblut leicht große Massen Blutfarbstoffkristalle herstellen. Allerdings hat dieses Verfahren den Nachteil, daß eine Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin sich nicht vermeiden läßt. Für manche Untersuchungszwecke ist das aber gleichgültig. Die ersten Versuche, Blutfarbstoff mit Ammoniumsulfat kristallinisch darzustellen, hat *Dittrich* [4]) ausgeführt; später hat *Schulz* [5]) ein Verfahren genauer beschrieben, das sich im wesentlichen mit den Vorschriften deckt, die *Micko* [6]) später gegeben hat. Pferdeblut,

[1]) *M. Arthus,* Verfahren, welches gestattet, leicht und schnell Kristalle von Oxyhämoglobin zu erhalten. Compt. rend. soc. biol. T. **47**. p. 686 (1895); sowie Zeitschr. f. Biol. Bd. **34**. S. 444—446 (1896).

[2]) *H. Frey,* Beiträge zur Kenntnis der Blutkristalle. Diss. Würzburg 1894. S. 228.

[3]) *Schuurmanns-Stekhoven,* Darstellung von kristallisiertem Oxyhämoglobin. Onderz. Physiol. Labor. Utrecht. 4. Reeks. Bd. **1**. S. 67; ausführlich beschrieben in der Abhandlung von *Klaveren.* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 296—297 (1901).

[4]) *P. Dittrich,* Über methämoglobinbildende Gifte. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **29**. S. 247—281 (1891).

[5]) *Fr. N. Schulz,* Die Eiweißkörper des Hämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **24**. S. 449—481 (1898).

[6]) *C. Micko,* mitgeteilt von *K. Spiro.* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **28**. S. 182 (1899).

mit Ammoniumoxalat ungerinnbar gemacht (siehe S. 338), wird mit dem zweifachen Volum Wasser verdünnt und im Eiskasten oder durch Eintragen gewogener Eisstücke gekühlt. Die abgekühlte Flüssigkeit wird mit Äther (auf 1 *l* 50—70 *cm*³) durchgerührt und dann mit 700 *cm*³ ebenfalls gekühlter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung pro Liter unter lebhaftem Umrühren versetzt. Es entsteht ein voluminöser Niederschlag von Fibrinogen und Globulin, der sich nach 5—15 Minuten hebt; wenn nicht, muß man noch vorsichtig etwas Äther hinzusetzen, jedoch nicht zu viel, da sonst das Oxyhämoglobin schon stärker mit auskristallisiert. Nach einigem Stehen in der Kälte findet sich an der Oberfläche ein blaßroter Niederschlag, während die darunter befindliche Flüssigkeit klar und dunkelgranatrot ist. Diese Flüssigkeit wird abgehoben und kalt filtriert. Durch die Kälte wird eine vorzeitige Kristallisation des Oxyhämoglobins vermieden. Der obenauf schwimmende Niederschlag, der übrigens die Stromata völlig mitgerissen hat, kann durch Filtration in der Kälte ebenfalls von der anhaftenden Mutterlauge befreit werden; er enthält dann nur Spuren von Blutfarbstoff. Die erhaltenen kalten Blutfarbstofflösungen werden in große Schalen gegossen und dann bei Zimmertemperatur unter zeitweisem Umrühren stehen gelassen. Es scheiden sich dann anfangs rote, später mehr bräunliche (Umwandlung in Methämoglobin) Kristalle aus. Die Kristallmasse wird dann auf *Büchner*schen Filtern zu einem festen Kristallkuchen abgesaugt, der aus prächtigen, großenteils makroskopischen, granatähnlichen Kristallen besteht. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ, die Filtrate von dem Kristallbrei sind kaum noch gefärbt. Die Kristallmassen können nach dem Auflösen in einfacher Weise durch Zusatz der entsprechenden Menge Ammoniumsulfat umkristallisiert werden. Andere Blutarten, z. B. Rinder- und Gänseblut, eignen sich nicht zu diesem Verfahren, dagegen ist es leicht, aus Kaninchenblut mit Ammoniumsulfat schöne Kristalle zu erhalten. [1])

Ein sehr schönes Demonstrationsobjekt für Oxyhämoglobinkristalle bietet gelegentlich der Inhalt der Hundezecken (Ixodes ricium), die, wenn sie sich mit Blut vollgesogen haben, von einem Brei schönster Kristalle erfüllt sind *(Grützner)*. [2])

D. Darstellung von Kristallen des Hämoglobins, Kohlenoxydhämoglobins, Stickoxydhämoglobins, Methämoglobins, Cyanhämoglobins, Cyanmethämoglobins. Die bisherigen Angaben beziehen sich auf das Oxyhämoglobin. Auch Hämoglobin, Methämoglobin, Cyanhämoglobin u. a. Derivate des Hämoglobins sind nach den gleichen Prinzipien in kristallisierter Form erhaltbar, wie das Oxyhämoglobin. Die Darstellung solcher Kristallpräparate ist aber viel schwieriger wie beim Oxyhämoglobin; es eignen sich also nur die Modifikationen, die zur Darstellung schwer

---

¹) Siehe auch bei *Schulz*, Die Kristallisation etc. S. 29—30.

²) *P. Grützner*, Über die Wirkung der Zecken auf tierisches Blut. Deutsche med. Wochenschr. Bd. 28. S. 555—556 (1902).

kristallisierbarer Oxyhämoglobine dienen. Hämoglobinkristalle werden nach *Nencki* und *Sieber*[1]) hergestellt, indem man Kristalle von Pferdeoxyhämoglobin in lauwarmem Wasser löst und dann mit etwas faulendem Blut versetzt und dann in einer Flasche mit doppelt durchbohrtem Stopfen, der Zu- und Ableitungsrohr trägt, durch einen Wasserstoffstrom von Luft befreit. Während der Wasserstoffdurchleitung werden die Leitungsröhren zugeschmolzen und die Flasche dann 8—14 Tage lang bei 20—25° gelassen. Die Bakterien verzehren während dieser Zeit den Sauerstoff, die violettrote Lösung enthält nur reduziertes Hämoglobin. Man zieht über das Ableitungsröhrchen dann einen Gummischlauch, der in abgekühlten absoluten Alkohol eintaucht, öffnet die Spitze des Ableitungsrohres durch Abbrechen und saugt durch abwechselndes Erwärmen und Abkühlen der Flasche 25 Volumprozente Alkohol zu der Hämoglobinlösung. Nach 12- bis 24stündigem Stehen bei 5—10° ist das reduzierte Hämoglobin in schönen glitzernden Tafeln und Prismen auskristallisiert. Für Kohlenoxydhämoglobin gilt die gleiche Vorschrift wie für Oxyhämoglobin. Zur Überführung von Oxyhämoglobin in Kohlenoxydhämoglobin genügt wegen der eintretenden festen Bindung das Durchleiten von CO durch eine genügend konzentrierte Oxyhämoglobinlösung. Das gleiche gilt für Stickoxydhämoglobin.

Zur Darstellung von Methämoglobin und Cyanhämoglobin (Cyanmethämoglobin von *Kobert*) gibt *v. Zeynek*[2]) folgende Vorschriften: Eine möglichst konzentrierte Lösung von kristallisiertem Pferdeoxyhämoglobin wurde mit frisch bereiteter Lösung von rotem Blutlaugensalz, welches durch Umkristallisieren gereinigt war, und dann im Dunkeln aufbewahrt wurde, versetzt, bis völlige Umsetzung in Methämoglobin erzielt war. Aus der abgekühlten Lösung wird durch etwa 25% kalten Weingeistes das Methämoglobin in der üblichen Weise kristallinisch abgeschieden. Die mit der Zentrifuge abgetrennten Kristalle werden mit eiskaltem Wasser gewaschen, ein- bis zweimal umkristallisiert und nun mit einer $^1/_2$%igen Blausäurelösung versetzt. Fast momentan löst sich der Kristallbrei auf den Zusatz der Blausäure auf, gleichzeitig schlägt die rehbraune Farbe in Rot um, welches dem einer Oxyhämoglobinlösung bis auf einen Stich in Gelbe gleicht. Die so erhaltene Lösung wurde mit destilliertem Wasser so weit verdünnt, bis der Farbstoffgehalt 25—30% betrug, und dann mit $^1/_4$ Volum abgekühlten Alkohols versetzt. Es bedurfte meist einer Temperatur von —10°, um in 1—2 Tagen eine reiche Ausscheidung mikroskopischer Kristalle von Cyanhämoglobin zu erzielen.

E. Kristallisation von Hämocyanin. Der im Blute von Octopus vulgaris vorkommende kupferhaltige Eiweißkörper, dessen sauerstoffhaltige

---

[1]) *M. Nencki* und *N. Sieber*, Venöse Hämoglobinkristalle. Ber. d. Deutschen Chem. Gesellsch. Bd. **19**. S. 128—130 (1886).

[2]) *R. v. Zeynek*, Über kristallisiertes Cyanhämoglobin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 426—450 (1901).

Verbindung (Oxyhämocyanin) sich durch ihre tiefblaue Farbe auszeichnet, ist von *Henze*[1]) zuerst kristallisiert dargestellt worden, indem er (anlehnend an das Verfahren von *Hopkins* und *Pinkus* zur Darstellung von Eieralbuminkristallen) das Blut zuerst mit konzentrierter Lösung von Ammoniumsulfat bis zur beginnenden Trübung versetzte, die Trübung mit wenig Wasser wieder auflöste und dann tropfenweise verdünnte Essigsäure zusetzte, bis von neuem eine geringe Fällung eintrat. Nach 1/2stündigem Stehen setzte sich ein kristallinischer Niederschlag am Boden ab. Aus der dekantierten Flüssigkeit ließ sich durch etwas Ammoniumsulfatlösung ein weiterer Kristallniederschlag erzielen. Die Kristalle sind gut ausgeprägt und zeigen schöne Doppelbrechung.

---

[1]) *M. Henze*, Zur Kenntnis des Hämocyanins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 370—384 (1901).

b) Gruppe der nicht kristallisierbaren Proteine.

α) Eigentliche Proteine.

Von **Franz Samuely,** Freiburg im Breisgau.

Die Proteine finden sich im tierischen Organismus — von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen — in kolloider Lösung. Aus diesen Lösungen können wir die Proteine isolieren, indem wir sie aus dem Solzustand in den Gelzustand überführen. Erst die aus den Lösungen gefällten Proteine können dann einer weiteren Reinigung unterzogen werden. Nur für eine beschränkte Zahl von Eiweißkörpern ist bis jetzt die Überführung in einen kristallisierten Zustand gelungen. Offenbar sind die kristallisationsfähigen Substanzen solche Proteine, die bei der mit ihnen vorgenommenen Fällung einheitlich ausfallen und durch die Prozesse der Isolierung in ihren Eigenschaften wenig oder gar nicht verändert werden.

Die überwiegende Zahl von Proteinen ist nur in amorpher Form darstellbar. Die Momente, welche eine Kristallisation verhindern, lassen sich nicht übersehen. Gewiß fehlt es für manche Substanzen bis jetzt an den geeigneten Methoden, da es z. B. bis jetzt nicht gelungen ist, das in der Natur in Kristallform vorkommende Ichthulin nach seiner Isolierung wieder in den kristallisierten Zustand überzuführen. Ebenso sicher aber liegt die wesentliche Störung der Kristallbildung in der mangelnden Einheitlichkeit und der leichten Veränderlichkeit der isolierten amorphen Proteine. Erfahrungsgemäß ist für die Gruppe der Globuline sogar der Kontakt mit Wasser different, so daß diese Proteingattung hierbei irreversibel denaturiert, d. h. unlöslich wird. Unter diesen Bedingungen versteht sich die Schwierigkeit der Kristallbildung von selbst. Andrerseits wissen wir, wie häufig geringfügige Kolloid- oder Salzbeimengungen die Eigenschaften eines anderen Kolloids beeinflussen. Nun pflegen wir die Proteine meist aus salzhaltigen Lösungen von Proteingemischen zu isolieren, deren quantitative Trennung kaum vollständig gelingt. Die kleinsten Spuren eines Proteins als Beimengung eines anderen können dessen Kristallisationsvermögen absolut verhindern. Unsere Methoden der Reinigung von solchen Beimengungen aber sind häufige Umfällungen oder Fraktionierung, d. h. Prozeduren, die ein Protein nicht unbeeinflußt lassen, so daß wir wiederum in den ersten Fehler im Versuch der Kristallerzeugung verfallen.

Wenn wir nun hinzufügen, daß unsere heutigen Methoden zur Darstellung amorpher Proteine in den wenigsten Fällen zu absolut reinen, einheitlichen Proteinkörpern führen, so wird es begreiflich, daß auch die Mehrzahl der Proteine bisher der Kristallisation widerstanden hat. Aus diesen einleitenden Worten geht aber bereits der Hinweis hervor, daß die in diesem Kapitel zu besprechenden Substanzen noch keineswegs als chemische Individuen in sensu stricto, sondern nur als mehr oder weniger gut studierte und erforschte Vertreter bestimmter Proteingattungen und Proteingruppen aufzufassen sind.

Methoden zum qualitativen Nachweis von Proteinen.[1])

Wir kennen als Mittel des qualitativen Eiweißnachweises zwei verschiedene Arten chemischer Reaktionen: 1. Koagulations- und Fällungsreaktionen und 2. Farbenreaktionen. Von jeder dieser beiden Gruppen sind Proben verwertbar; es muß aber bei jedem Proteinnachweis eine Mehrzahl von Reaktionen angestellt werden, um vor Täuschungen und Fehlschlüssen sicher zu gehen. So gibt es Proteine, die keineswegs in der Hitze koagulieren und doch die Farbenreaktionen geben. Andrerseits sind in der großen Gruppe der Eiweißkörper solche vorhanden, denen diese oder jene Farbenreaktion fehlt. Schließlich gibt es eine Anzahl organischer Substanzen, welche die Fällbarkeit durch bestimmte Reagenzien oder manche Farbenreaktion mit den Eiweißkörpern teilen, ohne selbst Proteine oder Proteide zu sein.

Daraus folgt aber die Notwendigkeit, sich niemals mit einer einzigen Probe zu begnügen; der negative Ausfall einer solchen entscheidet nicht unbedingt gegen eine Eiweißnatur. Auch hat die Anwendung mehrerer Eiweißreaktionen zugleich den Vorteil, über die Natur und Stellung eines Proteins in deren üblichem System Aufschluß zu geben. Und die Kenntnis von der Natur eines fraglichen Proteins ist gewiß von größerem biochemischen Interesse, als die einfache Feststellung einer Substanz als „Eiweiß“.

Fällungsreaktionen.

1. Koagulation durch Hitze. Man erhitzt eine auf Eiweiß zu prüfende Lösung in der Flamme zum Kochen und fügt nach dem Kochen wenige Tropfen einer sehr verdünnten Säure (am besten Essigsäure oder Salpetersäure) hinzu. Bleibt bei schwach saurer Reaktion eine vorher auftretende Trübung in flockiger Form bestehen, so liegt ein koagulables Eiweiß vor; durch Farbenreaktionen des abfiltrierten oder in Alkali bzw. Säure als Alkali- bzw. Säurealbuminat gelösten Körpers ergänzt man die Feststellung. Im allgemeinen wird man stets solche Lösungen prüfen, die als physiologische oder pathologische Flüssigkeiten oder als künstliche Extrakte

[1]) Anmerkung: Diese Ausführungen mehr allgemeinerer Natur gelten im wesentlichen für die ganze Gruppe der Proteine. Sie sind an dieser Stelle erwähnt, weil die meisten Beobachtungen zuerst an Proteinen der Tierwelt gemacht worden sind und für die Pflanzenproteine manche Verhältnisse anders liegen. Der Herausgeber.

bereits salzhaltig sind. Handelt es sich aber um salzfreie oder sehr salzarme Lösungen, in welchen die sichtbare Fällung des durch die Hitze denaturierten Eiweißes ausbleibt, so fügt man vor der Erhitzung ein Salz, z. B. Kochsalz, Kaliumphosphat oder Natriumsulfat, hinzu.

Die Proteine koagulieren bei bestimmten Koagulationstemperaturen, die für einzelne Proteine spezifische Konstanz aufweisen.

Bestimmung der Koagulationstemperatur. Man bringt die zu prüfende Eiweißlösung in eine mittelgroße Eprouvette. Die Höhe der Eiweißlösung in derselben soll etwa 5—6 *cm* betragen. Dieses Reagenzglas taucht man in ein mit Wasser gefülltes Becherglas derart, daß der äußere Wasserspiegel das Niveau der Eiweißlösung um weniges überragt. In die Außenflüssigkeit und in die Eiweißlösung taucht ein Thermometer. Für gute Temperaturablesungen ist es auch zweckmäßig, das Thermometer nicht in die Eiweißlösung selbst, sondern in ein mit Wasser gefülltes zweites Reagensglas tauchen zu lassen, das ebenso wie jene die Eiweißlösung beherbergende Eprouvette in das Becherglas versenkt ist. Das in diesem Wasserbad befindliche Wasser wird nun vorsichtig und langsam unter gutem Durchmischen mit einem Glasring erwärmt, wie dies bei den Schmelzpunktsbestimmungen geschieht.

Der Beginn der Koagulation ist an einer milchigen Trübung erkenntlich, die mit weiterem Steigen der Temperatur einer absoluten Undurchsichtigkeit der Lösung und mit beendeter Koagulation einer flockigen Abscheidung weicht; für alle drei Stadien der Eiweißfällung sind die Temperaturen zu notieren. Desgleichen wiederholt man die Bestimmung bei schnellem Erwärmen des Wasserbades und nach Eintauchen der Proteinlösung in das bereits bis nahe an die Koagulationstemperatur vorgewärmte Wasserbad.

Man hat daran festzuhalten, daß die Koagulationstemperatur von zahlreichen Momenten nach oben oder unten beeinflußt wird, so von der Schnelligkeit des Erwärmens, dem Salzgehalt und der Reaktion der Lösung, sowie von der Konzentration des gelösten Eiweißes selbst.

Vor allem muß im Gegensatz zu früheren Gewohnheiten, wenn möglich, jede gefundene Koagulationstemperatur (d. h. die Temperatur der flockigen Fällung) mit einem Vermerk über den Salzgehalt der Lösung und die Eiweißkonzentration versehen werden.

2. Fällung durch konzentrierte Salpetersäure. Man unterschichtet die Eiweißlösung mit einer kleinen Menge kalter konzentrierter Salpetersäure. An der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten entsteht bei Anwesenheit von Eiweiß ein weißer Ring eines Niederschlags. Es ist stets ratsam, diese sogenannte *Heller*sche Probe durch Schichtung auszuführen. Da es Proteine gibt, z. B. Albumosen, deren Fällung im Säureüberschuß löslich ist, so bewahrt die Schichtprobe vor Irrtümern. Andrerseits kann man sich durch Umschütteln der Lösungen nachträglich noch über eine eventuelle Löslichkeit des Präzipitats unterrichten.

3. Auch alle folgenden Eiweißproben durch Fällung mit Metallsalzen oder sogenannten Alkaloidreagenzien sind vorsichtig erst mit

kleinen Zusatzmengen und dann erst mit einem Überschuß des Fällungsmittels auszuführen. Als solche dienen: Kupfersulfat, Kupferacetat, Quecksilberchlorid, Eisenchlorid, Eisenacetat, Bleiacetat, Zinkacetat, Uranylacetat, Platinsalze und Kobaltsalze.

Da sich die verschiedenartigen Eiweißkörper gegen diese Metallsalze sehr verschiedenartig verhalten, so werden diese Reagenzien weniger zum qualitativen Nachweis des Eiweißes, als vielmehr zur Feststellung ihrer Gruppenzugehörigkeit verwendet.

Die gebräuchlichen „Alkaloidreagenzien" sind: Wasserstoffplatinchlorid, Wasserstoffquecksilberjodid, Wasserstoffwismuthjodid, Metaphosphorsäure, Molybdänsäure, Phosphormolybdänsäure, Wolframsäure, Phosphorwolframsäure, Allotellursäure, Ferrocyanwasserstoffsäure und Gerbsäure.

Von diesen komplexen organischen Säuren, die alle in stark sauren Eiweißlösungen von großer Verdünnung Fällungen erzeugen, sind für den rohen qualitativen Nachweis nur die beiden letzteren praktisch verwertbar.

4. Man säuert die fragliche eiweißhaltige Lösung mit Essigsäure oder Salzsäure stark an und fügt zu ihr einige Tropfen einer 15%igen Lösung von Ferrocyankalium. Eine sofort mit jedem Tropfen zunehmende Trübung beweist die Anwesenheit von Eiweiß. Auch hier ist in der Menge des Fällungsmittels Vorsicht geboten, da es Proteine gibt, welche im Überschuß des Fällungsmittels löslich sind.

Das auf dem Filter gesammelte Präzipitat gibt noch die Farbenreaktionen des Eiweißes.

5. Die Gerbsäure wird am zweckmäßigsten in Form der sogenannten *Almen*schen Lösung verwandt, welche 4 *g* Gerbsäure in 8 *cm*³ 25%iger Essigsäure + 190 *cm*³ 40—50% Alkohol enthält. Die Probe ist für genuine Eiweißkörper außerordentlich empfindlich.

6. Fällung durch organische oder anorganische Säuren (Essigsäure, Salzsäure etc.). Von den bisher genannten Fällungen ist diejenige Niederschlagsbildung zu unterscheiden, die auf dem Zerlegen eines Alkalieiweißsalzes in das freie Eiweiß mit Säurecharakter durch eine stärkere Säure beruht. Man achte in jeder Eiweißprobe auf diese Erscheinung, da auf diesem Weg der erste Anhaltspunkt über die Gruppenzugehörigkeit eines Proteins gewonnen wird. Eine solche Fällung ist eine reversible, d. h. der Körper ist nicht denaturiert und wieder in Alkalien löslich.

Jede solche Fällung hat mit einem Minimum von Säurezusatz zu beginnen, um die Möglichkeit einer Lösung im Säureüberschuß zu vermeiden bzw. später zu konstatieren oder Verwandlung in Umwandlungsprodukte (Acid- oder Alkalialbuminat) zu verhindern.

Eiweißfarbenreaktionen.

1. Biuretprobe. Man führt die Probe nur an Eiweißlösungen aus. Liegt ein wasser- oder alkaliunlöslicher Körper vor, so verwandelt man ihn durch Kochen mit heißer Lauge in ein lösliches Albuminat. Zu

der kalten Lösung setzt man einen Überschuß Natronlauge und dann 1 bis 2 Tropfen einer sehr verdünnten, kaum mehr gefärbten Kupfersulfatlösung. Es entsteht eine blauviolette bis rotviolette Färbung. Histone und Peptone geben die Probe mit einem Stich ins Burgunderrote. Jeder Überschuß von Kupfersulfat ist zu vermeiden, da sonst die violette Farbe verdeckt wird. Es empfiehlt sich auch hier, die Kupfersulfatlösung zu überschichten und eine langsame Diffusion beider Flüssigkeiten abzuwarten.

Die Probe gilt allgemein als eindeutig für Eiweißkörper. In jüngster Zeit aber sind synthetische Polypeptide dargestellt, welche diese Reaktion auch geben.

Im Verein mit der Ferrocyankaliumprobe aber ist die Biuretprobe entscheidend.

Es ist wichtig, die Biuretprobe nicht in Gegenwart größerer Mengen Ammonsalze vorzunehmen, da diese die Reaktion stören. Will man also die Probe an Fällungen, die durch Aussalzen mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewonnen sind, vornehmen, so verwendet man starkes Alkali. Hierdurch wird das Ammonsalz zersetzt. Dem alkalischen Filtrat fügt man dann 10 Tropfen einer Kupfersulfatlösung (2:100) hinzu.

Statt Kupfersalzen kann man auch Nickelsalze verwenden und erhält hierbei orangerote Farbe.

2. Die folgenden Reaktionen werden durch die Anwesenheit ganz bestimmter Bausteine im Eiweißmolekül vermittelt. Sie gestatten also einen indirekten Schluß auf die partielle Zusammensetzung und dadurch auch auf die Gruppenzusammengehörigkeit der Proteine. An sich sind sie nicht für ein Protein entscheidend, da sie auch mit jenen aus dem Proteinmolekül herausgelösten freien Bausteinen (Aminosäuren oder Kohlehydratgruppen) positiv ausfallen. Da wir im Laufe biochemischer Arbeiten solchen freien Substanzen nicht selten begegnen, so sind die Proben zum qualitativen Nachweis von Eiweiß in Lösungen tierischer Sekrete oder Produkte nicht geeignet. Ihr positiver Ausfall aber ist verwertbar, wenn die Proben an isolierten, gereinigten, genuinen oder denaturierten Proteinsubstanzen ausgeführt werden. Sie dienen also weniger dem Nachweis, als einer ergänzenden Identifikation.

Xanthoproteinreaktion. Man versetzt eine Lösung oder einen festen Körper, den man auf Eiweiß prüfen will, mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure und erhitzt langsam. Bei Eiweißgegenwart tritt eine zitronengelbe Färbung auf, die auf Zusatz von überschüssigem Alkali (NH_3 oder NaOH) in eine orangerote Farbe umschlägt.

Man kann bei positivem Ausfall anderer Farbenreaktionen auf diese Probe verzichten. Sie ist für Eiweiß nur dann eindeutig, wenn die zu prüfende Lösung nicht andere organische aromatische Substanzen enthält, die gleichfalls einer Nitrierung verfallen können.

*Millon*sche Reaktion. Man fügt zu einer Eiweißlösung etwas *Millon*sches Reagenz. (1 Teil Hg wird in 2 Teilen HNO_3 vom spez. Gew.

1·42 erst in der Kälte, dann durch Erwärmen vollständig gelöst. Nach dem Erkalten wird mit dem zweifachen Volumen Wasser verdünnt und von einem abgeschiedenen Bodensatz getrennt.) Es entsteht zunächst ein farbloser Niederschlag, der sich bei gelindem Erwärmen schön himbeerrot färbt. Auch die Flüssigkeit nimmt diese Färbung an. Da größere Mengen Kochsalz den positiven Ausfall der Probe hemmen können, so verwendet man möglichst verdünnte Lösungen. Die Probe ist durch die Anwesenheit aromatischer Phenolgruppen bedingt.

Die sonst bekannten Eiweißfarbenreaktionen, wie die Reaktion von *Hopkins* und *Cole* bzw. *Adamkiewicz,* die *Liebermann*sche Reaktion, die Reaktion von *O. Neubauer* und *Rohde,* die Schwefelbleireaktion und die Reaktion von *Molisch,* dienen weniger dem qualitativen Nachweis einer auf Eiweiß zu prüfenden Lösung, als vielmehr dem Nachweis bestimmter Bausteine und Molekülkomplexe in einem bereits als Eiweiß erkannten Körper. Ihre Besprechung liegt daher nicht im Bereich dieses Kapitels.

Über das Aussalzen der Proteine.

Trennung von Eiweißkörpern aus Gemischen. Alle Proteine werden durch Neutralsalze oder Metallsalze aus ihrer wässerigen Lösung ausgesalzen. Diese Art der Fällung ist eine reversible Aggregatsveränderung der Proteine, die gefällte Eiweißsubstanz wird nicht denaturiert und bleibt ohne Verlust ihrer chemischen Eigenschaften in den geeigneten Lösungsmitteln löslich. Die quantitative Ausfällung eines in Lösung befindlichen Proteins hängt von der Natur und der Menge des zur Aussalzung verwandten Salzes oder, was dasselbe ist, von dem Sättigungsgrad der Eiweißwassermischung an Salz ab. Es hat sich nun gezeigt, daß die die Ausfällung eben auslösenden und die eine quantitative Ausfällung beendenden Sättigungsgrade Konstanten sind, welche sowohl von der spezifischen Natur eines Proteins, als auch von der Natur des fällenden Salzes bedingt werden. Das genaue Studium dieser Verhältnisse hat nun für ein einheitliches Salz jene fällenden Sättigungsgrade an verschiedenen Proteinen festgestellt. Da nun, wie sich ergab, die Sättigungsgrenzen relativ wenig mit der Eiweißkonzentration einer Proteinlösung schwanken, da sich diese Grenzwerte auch in Eiweißgemischen nicht wesentlich verändern, und da schließlich die Sättigungsgrenzen eines einzigen Salzes eine spezifische Funktion einer ganz bestimmten Proteinklasse darstellt, so bietet die Anwendung der Aussalzung die Möglichkeit: Eiweißkörper durch Fraktionierung voneinander zu trennen, oder isolierte Proteinsubstanzen auf ihre Reinheit und Einheitlichkeit zu prüfen.

Natürlich bieten diese Methoden der Aussalzung heute auch die Mittel, die Gruppenzugehörigkeit eines Proteins in unserer üblichen Eiweißkörpersystematik festzustellen. Historisch betrachtet liegt die Sache nun eher umgekehrt. Denn das Verhalten der Proteine gegen Salzlösungen hat gerade zu unserer vorläufigen und willkürlichen Systematik geführt. Nachdem sich aber auch chemisch-analytische Momente ergeben haben, welche diese Systematik als begründet und brauchbar erwiesen haben,

dürfen wir heute ruhig sagen, daß die Bestimmung der Salzfällungsgrenzen ein erfreuliches Mittel zur Identifizierung der Gruppenzugehörigkeit eines Proteins bedeutet.

Man wird also in vielen Fällen eines positiven Proteinnachweises auch orientierende Versuche über die Salzfällbarkeit der fraglichen in Lösung befindlichen Eiweißkörper anstellen. Als fällende Salze werden verwendet: $NaCl$, $MgSO_4$, Na_2SO_4, Am_2SO_4, CH_3COOK, $ZnSO_4$.

Methode zur Bestimmung der Fällungsgrenzen eines in Lösung befindlichen Eiweißkörpers durch Aussalzen mit Hilfe von Neutralsalzen oder Metallsalzen (obere und untere Sättigungsgrenze):

Die Proteine werden durch gewisse Neutral- oder Metallsalze ausgesalzen. Die Abscheidung eines Proteins aus seiner Lösung beginnt dann, wenn die Lösung eine für jede Gruppe von Eiweißkörpern und für jedes angewandte Salz spezifische Salzkonzentration erreicht hat (untere Fällungsgrenze). Die Abscheidung schreitet dann mit dem Steigen des Salzgehaltes bis zu einer zweiten, ebenso spezifischen Konzentration fort (obere Sättigungsgrenze). Mit dieser Grenze ist die Abscheidung eine quantitative. Weiterer Salzzusatz führt nicht zur Abscheidung, es sei denn, daß es sich um Lösungen von Eiweißgemischen handelt, in denen die obere Sättigungsgrenze eines Körpers mit der unteren Sättigungsgrenze eines zweiten Proteins zusammenfällt. Um also diejenige Salzkonzentration zu bestimmen, bei der die Abscheidung eines Proteins oder einer Proteinfraktion beginnt, steigert man in gleichen abgemessenen Proben, z. B. durch Zufuhr von Ammonsulfat, den Salzgehalt der zu prüfenden Lösung bis zum Beginn einer Trübung und fährt dann mit dem Salzzusatz solange fort, bis eine Filtratprobe von dem entstandenen Niederschlag bei weiterem Salzzusatz keine Fällung mehr erzeugt. Handelt es sich um Lösungen mehrerer Eiweißkörper, so fährt man mit dem Salzzusatz auch dann noch weiter fort. Zunächst entstehen keine weiteren Trübungen. Von einem bestimmten Salzgehalt ab tritt wieder Trübung auf (untere Fällungsgrenze des zweiten Proteins). Nach vollständiger Aussalzung dieses zweiten Proteins läßt sich durch weiteren Salzzusatz keine Trübung mehr erreichen. Damit ist die obere Fällungsgrenze des zweiten Proteins erreicht bzw. überschritten.

Ausführung[1]): Als Fällungsmittel dienen gesättigte, kalte, neutrale Salzlösungen, z. B. neutrale, kalt gesättigte Ammonsulfatlösungen.

Mit einer Pipette mißt man in zahlreichen Reagenzgläsern je 2 cm^3 der zu untersuchenden Eiweißlösung oder einer Lösung des vorher rein dargestellten Proteins ab. In dieser Lösung bestimmt man vorher den Prozentgehalt an Eiweiß. Im allgemeinen prüft man die Fällungsgrenzen an 5%igen künstlichen Eiweißlösungen. Auch die Reaktion der Lösung ist zu beobachten und zu verzeichnen.

Diese Proben versetzt man nun mit einer gleichmäßig zunehmenden, in der Pipette abzumessenden Menge der Ammonsulfatlösung, indem man

[1]) *F. P. Pick,* Untersuchungen über die Proteinstoffe. II. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24. S. 246 (1897). — Derselbe, Zur Kenntnis der peptischen Spaltprodukte der Fibrine. Ibid. Bd. 28. S. 219 (1897). (Vgl. hierzu S. 361, Note 2 und 3.)

den Salzgehalt jeder nächstfolgenden Probe um 0·2 cm^3 der gesättigten Salzlösung steigert. Jede der angestellten Proben wird hierauf mit destilliertem Wasser auf das gleiche Volumen von 10 cm^3 aufgefüllt. Die Reihenfolge der Mischung ist zweckmäßig: Eiweißlösung, Wasser, Salzlösung. Die Konzentration, bei der die erste bleibende Trübung auftritt, wird als untere Fällungsgrenze verzeichnet.

Nunmehr läßt man die gut durchgemischten Proben, die durch Gummikappenverschluß der Eprouvetten vor Verdunstung geschützt sind, am besten 24 Stunden stehen, um die Abscheidung der Proteinfällung quantitativ zu Ende gehen zu lassen. Alsdann filtriert man die Proben durch doppeltes Papierfilter und prüft die klaren Filtrate auf einen etwa nicht ausgefällten Eiweißrest oder einen erst bei höherer Salzkonzentration ausfallenden Körper durch Zusatz von je 0·2—0·3 der gesättigten Salzlösung zu jeder Filtratprobe. Das hierbei zuerst vollständig klar gebliebene Gemisch zeigt die Probe an, in welcher die obere Sättigungsgrenze für den ursprünglich in Lösung gegebenen Körper erreicht war.

Um die notierten Sättigungsgrenzen vergleichbar zahlenmäßig auszudrücken, bezeichnet man dieselben mit derjenigen Anzahl Kubikzentimeter der gesättigten Salzlösung, die in einem Gesamtvolumen von 10 cm^3 eine erste Trübung erzeugt oder zur quantitativen Abscheidung ausgereicht hat.

Wenn also in einer 1%igen Eiweißlösung von 2 cm^3, die mit 5·2 cm^3 Wasser versetzt war, durch 2·8 cm^3 gesättigter Salzlösung die erste Trübung entsteht, so ist die untere Fällungsgrenze für den in Frage stehenden Körper 2·8 oder 28%. Bei Bestimmung solcher Zahlen ist es aber dringend nötig, dieselbe durch Angabe der Eiweißkonzentration und Reaktion der ursprünglichen Eiweißlösung zu ergänzen, da diese Fällungsgrenzen keineswegs physikalische Konstanten sind.

Wohl zu unterscheiden von diesen so bestimmten Zahlen sind jene Grenzwerte, die etwa durch Fällungen mit gepulvertem Salz in Substanz bestimmt sind. In solchen Fällen drückt man die Sättigungsgrenzen eines Proteins nicht in Kubikzentimetern einer gesättigten Salzlösung, sondern durch den absoluten Prozentgehalt der Eiweißlösung an zugesetztem Salz aus.

Methode der fraktionierten Eiweißfällung durch Aussalzen mit gesättigten Neutralsalzlösungen.

Sind in einer Lösung zwei oder mehrere Eiweißkörper enthalten, deren obere bzw. untere Fällungsgrenzen miteinander nicht zusammenfallen, so kann man dieselben fraktioniert aussalzen, d. h. man fügt zu der in Frage stehenden Lösung soviel gesättigter Salzlösung hinzu, daß die obere Sättigungsgrenze des ersten Körpers erreicht ist, filtriert ihn ab, wäscht mit einer dieser Sättigungsgrenze entsprechend verdünnten Salzlösung aus, und steigert nun in den vereinigten Filtraten den Salzgehalt derart, daß die Sättigungsgrenze des zweiten Proteins überschritten wird.

Vielleicht ist es zweckmäßig, an dieser Stelle die mathematischen Formeln wiederzugeben, nach denen man die Mengen der gesättigten Salz-

lösung bestimmt, die nötig sind, um eine Eiweißlösung auf einen gewünschten Sättigungsgrad, d. h. Gehalt an gesättigter Lösung, oder eine bereits zu einem bekannten Prozentsatz mit Salzlösung gesättigte Lösung auf einen nächst höheren, gewünschten Sättigungsgrad zu bringen. Wir erinnern dabei daran, daß sich der Begriff Sättigung in Prozenten nicht auf den Gehalt an Ammonsulfat, sondern auf die Volumina gesättigter Salzlösung bezieht.

I. Es sei A die Menge einer beliebigen Eiweißlösung in Kubikzentimetern. Dieselbe soll durch Z *cm*³ einer gesättigten Salzlösung zu $\frac{a}{b}$ gesättigt werden.

Dann ergibt sich

$$\frac{A + Z}{Z} = \frac{b}{a}, \text{ woraus folgt: } Z = \frac{a \, . \, A}{b - a}$$

II. Es sei A eine Menge einer Eiweißlösung in Kubikzentimetern, die bereits zu $\frac{a}{b} = s$ mit einer Salzlösung gesättigt ist. Dieselbe soll durch Zusatz einer unbekannten Menge Z der gleichen, gesättigten Salzlösung auf ein Sättigungsverhältnis von $\frac{a_1}{b_1}$ gebracht werden. Dann ergibt sich:

$$\frac{A + Z}{A \, . \, s + Z} = \frac{b_1}{a_1}, \text{ also } Z = \frac{A \, . \, (b_1 \, s - a_1)}{a_1 - b_1}$$

Beispiel. Es sollen aus einer Eiweißlösung von 100 *cm*³ 2 Eiweißkörper gefällt werden, deren erster bei einer Sättigung von $^2/_3$, d. h. 66·6% gesättigter Ammonsulfatlösung, und deren zweiter bei einer solchen von $^4/_5$, d. h. 80% Salzlösung gefällt wird.

$$Z = \frac{2 \, . \, 100}{3 - 2} = 200.$$ Ich füge also zu 100 *cm*³ Eiweißlösung 200 *cm*³ der gesättigten Am_2SO_4-Lösung. In den entstehenden 300 *cm*³ sind 200 *cm*³ gesättigter Salzlösung enthalten, also die Sättigung beträgt $^2/_3$. Ich filtriere von dem Niederschlag ab und wasche mit einer $^2/_3$ gesättigten Am_2SO_4-Lösung gut aus. (Die Lösung wird hergestellt aus 2 Teilen gesättigter Salzlösung + 1 Teil destillierten Wassers.) Das Gesamtvolumen des gewonnenen Filtrates beträgt 400.

$$Z = \frac{400 \, . \, (5 \, . \, \frac{2}{3} - 4)}{4 - 5} = \frac{-266·7}{-1} = +266·7.$$

Ich füge also zu den 400 *cm*³ noch 266·7 *cm*³ der gesättigten Salzlösung hinzu. Es fällt das zweite Protein aus, denn die entstehenden 666·7 *cm*³ der Flüssigkeit enthalten 266·7 *cm*³ Salzlösung von der zweiten Fällung + 266·7 *cm*³ von der ersten Fällung samt der Verdünnung, d. h. im ganzen 533·4 *cm*³ gesättigter Am_2SO_4-Lösung, d. h. die Lösung ist zu $^4/_5$ gesättigt.

Zur Systematik der Proteine.

Identifikation eines Proteins als Glied einer bestimmten Proteinklasse.

Die Methoden, welche das in der Überschrift bezeichnete Ziel verfolgen, ergeben sich aus den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine, aus dem einfachen Grunde, weil unsere Systematik willkürlich nur aus der Kenntnis dieser Eigenheiten aufgebaut ist. Wenn es auch den Anschein hat, daß chemische Differenzen tatsächlich die vorläufig gebildeten Gruppen auszeichnen, so müssen wir doch eingestehen, daß unsere Systematik von heute nur den Versuch einer Gliederung der so vielseitigen Eiweißkörper darstellt.

Auf Seite 358 u. 359 geben wir eine Tabelle wieder, in der die großen Gruppen der Proteinsubstanzen verzeichnet sind, und in die zugleich diejenigen Eigenschaften aufgenommen sind, welche heute die Anhaltspunkte für die Zusammengehörigkeit solcher Gruppen liefern. Daß selbst innerhalb der Glieder einer einzigen Gruppe Unterschiede der Eigenschaften vorkommen, versteht sich. Wir kennen fließende Übergänge von einer Gruppe zur anderen. Es ist daher auf die Mitteilung von Spezialreaktionen verzichtet. Nur diejenigen Reaktionen und Eigenschaften sind verzeichnet, die von genereller Bedeutung sind. Man ersieht aus der Tabelle, daß gerade diejenigen Reaktionen für eine Identifizierung wesentlich sind, die wir bereits zum qualitativen Nachweis dieses Proteins und zur Reinigung und Isolierung eines solchen angeführt haben. Je genauer diese dort beschriebenen Proben und Methoden befolgt werden und je zahlreicher die ausgeführten Vorproben sind, um so leichter wird die Identifikation eines Proteins gelingen, und nur in wenigen Fällen wird eine Analyse des dargestellten Proteins nötig werden.

Man wird nach Ausführung der Vorproben in der Tabelle sofort die Zugehörigkeit eines Proteins zu dieser Gruppe feststellen oder sicher zu anderen Gruppen ausschließen können.

Man bestimme die folgenden Punkte:

1. Feststellung, ob ein durch Hitze koagulables Eiweiß vorliegt und Bestimmung, ob im Filtrat dieses koagulablen Proteins noch ein anderer nicht koagulabler Eiweißkörper enthalten ist. (Anstellung der Biuretprobe und Ferrocyankaliprobe.)

2. Wiederholung dieses Versuches unter Anwendung von absolutem Alkohol im Überschuß als denaturierendes Agens.

3. Feststellung der Salzfällbarkeit des fraglichen Proteins durch Zusatz gesättigter Salzlösungen (mindestens 2 Salze: $MgSO_4$ und Am_2SO_4) in verschiedenen Volumverhältnissen (Halbsättigung, $^2/_3$-Sättigung, Ganzsättigung) unter Untersuchung der Filtrate auf Fraktionen, die erst bei höherer Salzsättigung ausfallen.

4. Kontrolle über die Löslichkeit der durch Aussalzen gewonnenen Körper, in Alkali, Säure, in salzhaltigem Wasser oder salzfreiem Wasser

(durch Dialyse der salzhaltigen Lösung). Der Dialysenversuch kann auch mit der ursprünglichen Lösung der Proteine ausgeführt werden.

5. Feststellung der Fällbarkeit des nun in Lösung befindlichen Proteins durch Säuren oder Alkalien (NH_3), d. h. ob das fragliche Protein von stärker basischem oder stärker sauerem Charakter ist. Die Probe ist auch an der genuinen ursprünglichen Eiweißlösung zu prüfen, ist aber erst eindeutig zu verwerten, wenn durch die Methoden der Salzfällungen Gemische von Proteinen getrennt sind. Bei Fällungen ist die Reaktionsveränderung mit Lackmuspapier genau und schrittweise zu kontrollieren und zugleich die Löslichkeit in Säure- oder Alkaliüberschüssen festzustellen.

6. Feststellung über den Schwefel und Phosphorgehalt der durch Salzfällung oder Säure- bzw. Alkalifällung isolierten Substanz. Der Bestimmung muß eine Reinigung durch mehrfach wiederholte Umfällung vorangehen.

7. Feststellung über den Gehalt einer Kohlehydratgruppe oder von Purinbasen in den Hydrolysenlösungen der durch Säuren zerlegten Substanzen. Farbenreaktionen auf Kohlehydratgruppen sind allein nicht entscheidend.

8. Spezialreaktionen durch Fermente (Thrombin, Lab, Pepsin, Trypsin).

Die methodischen Hinweise für die Ausführung dieser 8 Aufgaben ergeben sich zum Teil aus den vorangehenden Kapiteln, zum Teil aus den Details der Darstellungen in den folgenden Absätzen und Kapiteln. Die Tabelle soll nur die rasche Identifikation einer Proteingruppe ermöglichen. Alle Spezialreaktionen sind in den deskriptiven Handbüchern der Biochemie aufzufinden.

Wir gehen nun zu der Besprechung der speziellen Darstellungsmethoden der tierischen Proteine über. Aus praktischen Gründen ist das Material zunächst so geordnet, daß erst die Methoden zur biochemischen Aufarbeitung solcher Gewebsflüssigkeiten, Sekrete und Organe behandelt werden, die auf ihren Eiweißgehalt genau analysiert und untersucht sind und deren Proteine das größte praktische Interesse haben.

Die Methoden stellen zum Teil geradezu typische Vorbilder dar, nach denen die Untersuchung jeder proteinhaltigen Lösung vorgenommen werden kann.

I. Die Eiweißkörper des Blutes.

Im Blut kommen folgende Eiweißkörper vor: Serumalbumin, Serumglobuline, Fibrinogen, Fibrinoglobulin, Serumnukleoproteid, Serummukoid.

1. Serumalbumin, vgl. S. 337.

2. Serumglobulin ist der Hauptvertreter der Gruppe der Globuline. Es hat die Eigenschaften dieser Proteinklasse: Unlöslichkeit in Wasser (vgl. unten), Löslichkeit in verdünnten Neutral-Salzlösungen und Alkalien, Fällbarkeit durch schwache, verdünnte Säuren, Löslichkeit im Säureüberschuß.

Aus diesen wesentlichsten Eigenschaften ergeben sich die Prinzipien der Serumglobulindarstellung und Reinigung. Man hat zwei Arten der

Reagenzien	Albumine	Globuline	Nukleo-albumine	Vitelline
Spezialreaktionen	—	—	Paranuklein bei Verdauung, phosphorhaltig	P-haltig, zum Teil eine Kohlehydratgruppe enthaltend
Wasser	löslich	meist unlöslich	unlöslich	unlöslich
Kochen	koaguliert nur bei Salzgegenwart	koaguliert bei Salzanwesenheit	nicht koaguliert, nur die Salze koagulieren	koaguliert
Alkohol	gefällt und koaguliert	gefällt und koaguliert	gefällt und koaguliert	gefällt, nicht koaguliert
5—10%ige Lösung von Neutralsalzen	löslich	löslich	unlöslich	löslich in 10% NaCl, sonst unlöslich*)
gesättigte Lösung von NaCl	bis 100% nicht gefällt*)	zum Teil 100% gefällt	als Salze fällbar	—
desgleichen von $MgSO_4$	bis 100% nicht gefällt*)	100% gefällt	als Salz fällbar	—
desgleichen von Am_2SO_4	bei 100% ganz gefällt	50% gefällt	als Salz fällbar	—
verdünntes Alkali NaOH oder NH_3	löslich, in Alkalialbuminat übergehend	löslich, verw. in Alkalialbuminat	löslich	löslich
verdünnte Säuren	löslich, sehr leicht in Acidalbuminat übergehend	fällbar aus alkalischer Lösung, Überschuß löslich zu Acidalbuminat	gefällt, schwer löslich im Überschuß von CH_3COOH	gefällt aus alkalischer Lösung, im Überschuß zum Teil löslich
konzentrierte Mineralsäuren	gefällt	gefällt	löslich	gefällt
konzentrierte Salpetersäure	gefällt, Wärme unlöslich	gefällt, Wärme unlöslich	gefällt, löslich im Überschuß	gefällt
Ferrocyankali + Essigsäure	gefällt	gefällt	gefällt	gefällt
Gerbsäure + Mineralsäure	gefällt	gefällt	gefällt	—
Phosphorwolframsäure	gefällt	gefällt	gefällt	—
Bemerkungen	*) bei saurer Reaktion durch 100% NaCl oder $MgSO_4$ gefällt	Kristalline sind in Wasser löslich	Die Reaktionen sind nur mit den wasserlöslichen Alkalisalzen ausführbar	*) Ichthulin in verdünnten Neutralsalzen löslich

Die Protamine und eiweißartigen Abbauprodukte

Nukleoproteide	Schleimsubstanzen	Albumoide	Histone
P-haltig. Purinbasen-, Pyrimidinbasen-, Kohlehydrathaltig	enthalten zum Teil Glukosamin und zum Teil Chondroitinschwefelsäure	zum Teil gegen Fermente resistent	—
unlöslich. Salze sind löslich	löslich	meist unlöslich	unlöslich, nur als Salze löslich
nicht koaguliert	nicht koaguliert, zum Teil leicht verändert	nicht fällbar, nicht koaguliert	gefällt, Koagulat leicht löslich in Säuren
gefällt, nicht koaguliert	gefällt, nicht koaguliert	zum Teil aus saurer Lösung fällbar	gefällt
unlöslich	löslich	unlöslich	unlöslich
gefällt	fällbar	zum Teil fällbar (Kollagen)	gefällt
gefällt	fällbar	zum Teil fällbar (Kollagen)	gefällt } aus neutraler Lösung
gefällt	fällbar	zum Teil fällbar	gefällt
löslich	löslich	löslich	unlöslich auch im NH_3-Überschuß *)
unlöslich, d. h. aus Salzen fällbar, zum Teil schwer löslich im Überschuß von Essigsäure	gefällt, unlöslich im Überschuß	gefällt	löslich
gefällt	—	gefällt	nicht fällbar
gefällt	—	gefällt	fällbar, löslich in der Wärme, wiederkehrend in der Kälte
gefällt	nicht gefällt (Ausnahmen vorhanden!)	gefällt	gefällt
—	gefällt	wenn wasserlöslich, gefällt	—
—	gefällt	zum Teil gefällt	—
geben bei Pepsin-HCl-Verdauung Nukleine bzw. durch Säurehydrolyse Nukleinsäuren	Pseudomuzin ist mit Essigsäure nicht fällbar	—	*) In Überschuß von fixem Alkali löslich

(Albumosen und Peptone) sind nicht verzeichnet.

Methoden zu unterscheiden: 1. Die Methode der Säurefällung. 2. Die Methoden, welche die zur Lösung des Globulins optimale Salzkonzentration nach unten durch starkes Verdünnen, nach oben durch Salzzusätze (Neutralsalze) verschieben.

In der jüngsten Zeit haben sich immer mehr Stimmen erhoben, welche die Einheitlichkeit des von *Panum* entdeckten Serumglobulins bezweifeln, da man einerseits wasserlösliche Anteile dieses Globulins neben wasserunlöslichen fand, da man ferner durch die Methode der fraktionierten Aussalzung mit Ammonsulfat oder Kaliumazetat Fraktionen von deutlich verschiedenen Fällungsgrenzen und spezifischen biologischen Eigenschaften isolieren konnte. Es soll hier diese Frage nicht kritisch behandelt werden. Wir geben die gebräuchlichen Methoden wieder mit dem Hinweis, daß bei der Kompliziertheit der Verhältnisse ein abschließendes Urteil bis jetzt nicht möglich ist.

I. Darstellung von Globulin aus Blutserum durch Verdünnen oder Ansäuern nach *Hammarsten*.[1])

Frisches, zellfreies Rinderblutserum wird mit der 10—15fachen Menge Wasser verdünnt. Durch Einleiten von CO_2 während $^1/_2$—2 Stunden entsteht ein Niederschlag. Statt der CO_2-Fällung kann man vor Verdünnen schon mit verdünnter Essigsäure schwach ansäuern.

Nach 24 Stunden filtriert man vom Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser aus, löst ihn dann in möglichst wenig verdünntem Alkali und fällt erneut mit wenig Essigsäure. Diese Umfällung wird mehrfach wiederholt.

Statt der Reinigung durch Umfällen aus alkalischer Lösung kann man den Niederschlag auch in verdünnter Kochsalzlösung lösen und erneut durch Zusatz von viel Wasser abscheiden.

Der Niederschlag wird dann auf dem Filter salzfrei gewaschen, eventuell durch Alkohol denaturiert und nach Ätherbehandlung getrocknet.

Beurteilung: Die Methode führt in relativ kurzer Zeit und einfacher Weise zu einem Globulinpräparat, das aber nicht frei von Fibrinogen und Fibrinoglobulin ist. Man gewinnt auch nicht die Gesamtmenge des Globulins. *Huiscamp*[2]) hat ferner neuerdings darauf hingewiesen, daß man zwischen einem durch Essigsäure fällbaren Globulin und einem beim Verdünnen ausfallenden Globulin unterscheiden müsse. Das letztere, das Salzglobulin, fällt dann aus, wenn die Serumflüssigkeit einen Salzgehalt von 0·3% enthält, ein Zustand, der durch den Prozeß der Verdünnung erreicht wird. Wenn wirklich beide Körper chemisch verschiedene Substanzen darstellen, so gewinnt man bei der obigen Methode sicher ein Gemisch.

---

[1]) *O. Hammarsten*, Über das Paraglobulin. I. *Pflügers* Archiv. Bd. **17**. S. 413 (1878). — Derselbe, Über das Paraglobulin. II. Ebenda. Bd. **18**. S. 38 (1878). — Derselbe, Über das Fibrinogen. Ebenda. Bd. **22**. S. 431 (1880).

[2]) *W. Huiscamp*, Über die Fällung des Serumglobulins im Blutserum mittelst Essigsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 394 (1906).

II. Darstellung von Serumglobulin durch Aussalzen mit Neutralsalzen.

1. Fällung mit Magnesiumsulfat nach *Hammarsten*[1]: Man versetzt das neutrale, verdünnte oder unverdünnte Blutserum bei 30° unter tüchtigem Umrühren mit festem, fein gepulvertem Magnesiumsulfat bis zur Sättigung. Es entsteht eine voluminöse Fällung, die sich nach einiger Zeit abfiltrieren läßt. Der Filterrückstand wird mit gesättigter, neutraler Magnesiumsulfatlösung gewaschen, durch Wasserzusatz gelöst und erneut in der beschriebenen Weise mit $MgSO_4$ gefällt. Der abfiltrierte Rückstand kann in Wasser gelöst und durch Dialyse salzfrei gefällt werden.

Beurteilung. Die Abtrennung der Globuline von dem Serumalbumin ist auf diese Weise eine vollständige. Wenigstens findet sich im Filtrat des $MgSO_4$-Niederschlags kein Protein von Globulineigenschaften.

Der Niederschlag enthält Fibrinogen und Fibrinoglobulin, von denen er, wenn es sich um eine Reindarstellung handelt, getrennt werden muß. Bei der Salzbefreiung durch Dialyse bleibt ein Teil des Globulins gelöst, der ausfallende Teil wird bei längerer Berührung mit Wasser auch in verdünnten Salzlösungen unlöslich. Ob man mit *Burckhardt* oder *Howell* an der Identität des gesamten Magnesiumsulfatniederschlags mit dem Globulin zweifelt, hängt lediglich davon ab, ob man für die Definition eines Globulins die alten klassischen Eigenschaften desselben verwertet oder den ganzen Globulinbegriff neu umschreibt.

2. Fällung mit Ammoniumsulfat (*Kauder*[2], *Pohl*[3]): Man versetzt das verdünnte oder unverdünnte, schwach alkalische Blutserum mit dem gleichen Volumen einer neutralen, gesättigten Lösung von Ammonsulfat. (Die ersten Zusätze erzeugen noch keine Fällung, da die untere Sättigungsgrenze des Globulins bei 24%iger Salzsättigung liegt.) Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert und mit einer halbgesättigten Lösung von Ammonsulfat gewaschen. Zur Reinigung wird in Wasser oder Kochsalzlösung gelöst und erneut unter Halbsättigung der Lösung mit Ammonsalz gefällt. Diese Prozedur wird ein drittes Mal wiederholt; der letzte Niederschlag wird auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis das Filtrat keine oder nur angedeutete Biuretreaktion gibt. Dann wird scharf abgepreßt und 24 Stunden lang dialysiert. Der durch abgeschiedenes Globulin getrübte Schlauchinhalt wird mit einer überschüssigen Menge Alkohol versetzt und dann filtriert. Der Filterrückstand bleibt längere Zeit mit Alkohol in Kontakt, wird dann mit Äther nach-

---

[1] *O. Hammarsten*, Über die Anwendung des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8. S. 467 (1897).

[2] *G. Kauder*, Zur Kenntnis der Eiweißkörper des Blutserums. Arch. f. experim. Pharm. Bd. **20**. S. 411 (1886).

[3] *J. Pohl*, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Arch. f. experim. Pharm. Bd. **20**. S. 426 (1886).

gewaschen und getrocknet. Der resultierende denaturierte Körper stellt die Gesamtheit der Serumglobuline dar.

Beurteilung. Die Methode führt zu einer quantitativen Trennung der Globuline von dem Serumalbumin. Die Fällung mit Ammonsulfat ist daher zur Methode quantitativer Globulinbestimmung in allen eiweißhaltigen Flüssigkeiten verwertbar (siehe Harn, Serumtrans- und -Exsudate). Der niedergeschlagene Körper stellt aber ein Rohprodukt dar, da er das Fibrinogen und Fibrinoglobulin enthält.

Darstellung von fibrinogenfreiem Serumglobulin (*Reye*[1]).

Man versetzt je 2 Teile unverdünntes Serum mit 5 Teilen Wasser und 3 Teilen gesättigter Ammonsulfatlösung. Es entsteht eine Fällung, welche neben etwas Globulin das Fibrinogen und Fibrinoglobulin enthält. Man filtriert ab und setzt nun zu dem Filtrat soviel der Ammonsalzlösung, daß eine nahezu halbgesättigte Lösung entsteht. Der nun entstehende Serumglobulinniederschlag wird wie vorangehend beschrieben behandelt und gereinigt. Auch diese Methode ist zur quantitativen Bestimmung von Fibrinogen neben Serumglobulin und Serumalbumin im Blutserum verwertbar (vgl. Blutserum). Die Trennung der Fibrinogene von Globulin durch fraktionierte Koagulation führt nicht zu sauberer Trennung.

3. Die Fällung des Serumglobulins mit Kaliumacetat bietet vor der Fällung mit Ammonsulfat keine Vorzüge.[2])

Versuche, das Globulin in Einzelfraktionen zu zerlegen:

1. Trennung in wasserlösliches und wasserunlösliches Globulin durch Dialyse. Man verwendet die salzhaltige Lösung eines nach *Hammarsten* oder *Kauder* dargestellten Globulins. Dasselbe wird in Wasser, wenn nötig in einer Kochsalzlösung gelöst und der Dialyse unterworfen. Es scheidet sich ein Globulin als unlöslicher Körper aus, ein zweites Globulin bleibt in Lösung. Dasselbe kann durch eine der genannten Methoden aus seiner Lösung ohne Denaturierung dargestellt oder denaturiert durch Alkoholzusatz gefällt werden (*Marcus*[3]).

2. Trennung durch fraktionierte Salzfällung in Euglobulin und Pseudoglobulin aus Serum oder Globulinlösungen (*Spiro* und *Fuld*[4]). Man bringt das Serum auf eine Sättigung von 24% Ammonsulfat und filtriert von dem Fibrinoglobulin ab. Das Filtrat wird auf eine Sättigung von 33% Ammonsulfat gebracht (Zufügen vom halben Volumen der vor-

[1]) *W. Reye*, Über Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Inaug.-Dissertation. Straßburg 1898.

[2]) *S. Wallerstein*, Quantitative Bestimmung der Globuline im Blutserum und in tierischen Flüssigkeiten. Inaug.-Dissertation. Straßburg 1902.

[3]) *E. Marcus*, Über ein wasserlösliches Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28. S. 559 (1899).

[4]) *E. Fuld* und *K. Spiro*, Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31. S. 407 (1902).

handenen Eiweißlösung). Der sich abscheidende Niederschlag stellt das Euglobulin dar. Man filtriert ab und reinigt durch Umfällen etc. in der beschriebenen Weise. Das Filtrat des Euglobulins scheidet oberhalb einer jetzt steigenden Sättigung von 34% Salz einen neuen Körper ab, dessen Sättigung mit 46% (also durch Zufügen von einem drittel Volumen gesättigter Salzlösung zum jetzt vorhandenen Volumen der Salzglobulinlösung) beendet ist. Er stellt das Pseudoglobulin dar. Die Reinigung erfolgt in gleicher Weise.

Die Fraktionierung von Euglobulin und Pseudoglobulin durch Halbsättigung mit Kaliumacetat bietet keine Vorteile vor der Verwendung von Ammonsulfat.

3. Kombination der Salzfällung und Dialyse nach *Freund* und *Joachim*.[1]) Man trennt in der nach 2. beschriebenen Weise in Eu- und Pseudoglobulin. Beide Niederschläge werden in Wasser gelöst, zweckmäßig zu der ursprünglichen Konzentration der Ausgangslösung an Eiweiß, und 2—3mal durch Fällen mit Am_2SO_4 und Lösen in Wasser gereinigt. Die Pseudoglobulinlösung wird vor der weiteren Verarbeitung durch $^1/_3$ Am_2SO_4-Sättigung noch einmal auf Euglobulinbeimengungen geprüft und, wenn nötig, durch Filtration davon befreit.

Beide Lösungen (Euglobulin = I, Pseudoglobulin = II) werden nun 4—6 Wochen lang der Dialyse gegen strömendes Wasser unterworfen. In I und II kommt es zur Abscheidung eines unlöslichen Globulins, während ein zweiter Globulinanteil in Lösung bleibt.

Es wird vom Ungelösten abfiltriert. Der Filterrückstand wird bis zum Ablaufen abiureter Waschflüssigkeiten gewaschen, danach solange mit 0·6% Kochsalzlösung extrahiert, als noch Eiweiß in Lösung geht. Bei dem unlöslichen Globulin von I und II bleibt ein Teil in Kochsalz ungelöst; derselbe wird aber durch 0·25% Na_2CO_3-Lösung gelöst.

Beurteilung: Inwieweit bei der letzten Fraktionierungsmethode sekundäre Veränderungen nur eine Vielheit spezifischer Globuline vortäuschen oder wirklich chemisch differente Individuen vorliegen, entzieht sich vorläufig der sicheren Beurteilung *(Taylor)*.

Einige Eigenschaften der Serumglobuline und ihrer Einzelfraktionen:

Die mittlere Zusammensetzung eines nach *Hammarsten* dargestellten Globulins beträgt C 52·71, H 7·01, N 15·85, S 1·11%, nach *Mörner* 1·02% S und 0·67% bleischwärzender Schwefel. Koagulationstemperatur in 10%iger NaCl-Lösung 69—76°, meist 75°. $(\alpha)_D = -47·8°$.

Eine Beteiligung eines Kohlehydrats am Aufbau des Serumglobulins, die wiederholt behauptet wurde, scheint nicht zu existieren. Reduzierende Substanzen, die unter den Produkten der Säure- oder Barytspaltung gefunden wurden, dürften Verunreinigungen entstammen.

---

[1]) *E. Freund* und *J. Joachim*, Zur Kenntnis der Serumglobuline. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **36**. S. 407 (1902).

Euglobulin fällt bei Halbsättigung seiner Lösung mit Kaliumacetat und ist durch Essigsäure und Dialyse fällbar *(Spiro)*.

Pseudoglobulin zeigt diese drei Eigenschaften nicht.

Außer diesen beiden Fraktionen haben *Spiro* und *Porges*[1]) durch Ammonsulfatfraktionierung ein drittes Globulin bestimmt, so daß sich für sehr verdünnte Lösungen des Globulins die folgenden Fällungsgrenzen mit Ammonsulfat ergeben und die folgenden Globuline ausfallen:

	C	H	N	S	$(\alpha)_D$	
30—37% Sättigung	52·68	7·65	16·03	1·13	49°	Koag.-Temp. in
37—44% „	50·48	7·78	15·5	0·98	41°	5%iger Am_2SO_4-
44—50% „	47·52	8·14	14·4	0·92	42°	Lösung 70—75°.

Qualitativer Nachweis eines Globulins.

Man fällt das Globulin aus der zu prüfenden eiweißhaltigen Lösung durch Halbsättigung mit Ammonsulfat. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und in wenig Wasser gelöst. Man bestimmt den Koagulationspunkt der Lösung. Temperaturen zwischen 65—76° zeigen die Gegenwart eines Globulins an. Trübungen, die bei 55° entstehen, entstammen dem Fibrinogen.

Eine andere Probe der fraglichen Eiweißlösung wird dialysiert. Ein Niederschlag, der in verdünnten Salzlösungen löslich und durch Verdünnen und Ansäuern fällbar ist, beweist die Anwesenheit eines Globulins.

Über Nachweis und die quantitative Bestimmung siehe bei den Organ- und Körperflüssigkeiten (S. 327 f.).

Fibrinogen ist ein Protein mit Globulineigenschaften, das durch die Wirkung eines Fibrinfermentes in Fibrin übergeht.

Reindarstellung aus Blutserum nach *Hammarsten*[2]) (das klassische Verfahren hat durch *Heubner*[3]) einige Ergänzungen erfahren).

Mehrere Liter des frischen, durch Zusatz von 0·3—1% Kaliumoxalat oder 0·2—0·3% Ammoniumoxalat ungerinnbar gemachten Pferdeblutes werden scharf abzentrifugiert. Das Oxalatplasma bleibt über Nacht bei kühler Temperatur (Kühlraum oder Eisschrank) stehen und wird nach 24 Stunden durch Abhebern und Zentrifugieren von Zellresten und einem sich beim Stehen abscheidenden, profermenthaltigen Niederschlag getrennt. (Das Absetzen dieses Niederschlags ist abzuwarten, da sonst keine profermentfreien Lösungen entstehen!) Unter Umständen kann das frische Oxalatblut auch sofort durch 1—2stündiges Zentrifugieren von körperlichen Elementen befreit werden.

---

[1]) *O. Porges* und *C. Spiro*, Die Globuline des Blutserums. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 3. S. 277 (1902).

[2]) *O. Hammarsten*, Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 22. S. 333 (1896).

[3]) *W. Heubner*, Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. Arch. f. exp. Pharm. u. Path. Bd. 49. S. 229 (1903).

Das filtrierte, stark alkalisch reagierende Pferdeblutplasma wird (frühestens 3—4 Stunden nach der Blutentnahme) vollständig mit kalkfreiem Kochsalz gesättigt. Das hierbei ausfallende Globulin- und Fibrinogengemisch steigt an die Oberfläche und wird abfiltriert. Es wird alsdann in wenig 5%iger Kochsalzlösung gelöst und mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung versetzt (Halbsättigung). Der entstehende Niederschlag besteht aus Rohfibrinogen. *Heubner* empfiehlt bei der Halbsättigung eine strenge Kontrolle des Salzgehaltes mit Hilfe des Aräometers vorzunehmen, um einen Überschuß von Kochsalz zu vermeiden. Ein zu Wenig an fällendem Salz ist unschädlich. Der Niederschlag wird dekantiert, filtriert und mit Filtrierpapier abgepreßt, alsdann in einer 5—8%igen Kochsalzlösung gelöst und durch Halbsättigung mit Kochsalz erneut gefällt. Diese Umfällung wird 3—4mal in gleicher Weise wiederholt, so daß das Filtrat der letzten Fällung nahezu eiweißfrei ist.

Die zuletzt gewonnene Kochsalzlösung wird abfiltriert, gut mit Filterpapier abgepreßt, mit Hilfe der noch anhaftenden Salzreste in wenig Wasser gelöst und gegen ganz schwache Natronlauge 2 Tage bei 0° dialysiert (0·003% NaOH). Es entstehen so etwa 0·9% enthaltende Fibrinogenlösungen, die nahezu salzfrei sind. Die nicht dialysierten Lösungen enthalten 1—2% Fibrinogen neben 1—2% Kochsalz und Spuren Kaliumoxalat.

Zur Hebung der Ausbeute, besonders aber bei Verwendung von Rinderblut ist es zweckmäßig *(Heubner)*, die jeweiligen Niederschläge der Kochsalzhalbsättigung in der 5%igen NaCl-Lösung durch Zusatz einer Spur von Na_2CO_3 bei alkalischer Reaktion zu lösen, die erneute Kochsalzfällung aber erst nach genauer Neutralisation dieser Lösungen mit Essigsäure zu vollziehen.

Um das Unlöslichwerden von Fibrinogenanteilen zu vermeiden, darf man die Niederschläge der Salzfällungen nicht unter Wasser stehen lassen.

Aus der nahezu salzfreien Lösung kann das Fibrinogen durch Koagulieren, d. h. Erhitzen auf 58—60° während mehrerer Minuten, oder durch Alkoholzusatz denaturiert dargestellt werden.

Zur äußersten Reinigung des Fibrinogens von Fibrinoglobulinbeimischungen wird die salzfreie Fibrinogenlösung mit dem doppelten Volumen einer gesättigten Natriumfluoridlösung gefällt. Der Niederschlag (gallertig bei Pferdefibrinogen, flockig bei Rinderfibrinogen) wird in Wasser, das 0·05% Ammoniak enthält, gelöst. Nach Zusatz von 3—5% Kochsalz kann diese Reinigung durch abermaliges Fällen mit Natriumfluorid wiederholt werden. Aus den NH_3-, NaCl- und NaFl-haltigen Lösungen wird das Fibrinogen durch Erhitzen auf 56—58° während 5 Minuten auskoaguliert (*Huiscamp*[1]).

Alle auskoagulierten Fibrinogene werden mit heißem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und schließlich bei 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

---

[1]) *W. Huiscamp*, Zur Fibrinoglobulinfrage. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 44. S. 182 (1904).

Im allgemeinen wird man für praktische Arbeiten nur die Darstellung reiner Lösungen erstreben.

Reindarstellung nach *Reye* (l. c. S. 362, Note 1). Frisches, durch Zusatz von Natriumfluorid (0·56—0·6%) ungerinnbar gemachtes Blut wird durch Zentrifugieren von Blutkörperchen befreit. 12 Teile Plasma werden dann mit 30 Teilen Wasser verdünnt. Diese Verdünnung ist nötig, um für die folgende Salzfällung das Kollidieren der Fällungsgrenzen von Fibrinogen und Globulin etc. zu verhindern. Zu der verdünnten Lösung fügt man nun 16 Teile einer neutralen gesättigten Ammonsulfatlösung.

Der entstehende, sich bald absetzende Niederschlag wird abfiltriert, eventuell aus 5%iger NaCl-Lösung in der gleichen Weise mit Am_2SO_4 neu gefällt und schließlich auf dem Filter mit einer entsprechend verdünnten Ammonsulfatlösung (nicht über 28%ig) bis zum Verschwinden der Biuretreaktion im Filtrat gewaschen. Der Filterrückstand, meist ein schneeweißer, flockiger Niederschlag, wird an der Luft getrocknet, bei 80° koaguliert und mit heißem Wasser nahezu salzfrei gewaschen, schließlich zur Gewichtskonstanz bei 110° getrocknet.

Beurteilung: Zur Darstellung ist die alte Methode nach *Hammarsten* vorzuziehen. Zur quantitativen Bestimmung relativer Fibrinogenmengen hat sich die Methode von *Reye* bewährt.

Darstellung von Fibrinogen nach *W. Huiscamp.*[1])

Das Pferdeblut wird in 1%igem Kaliumoxalat aufgefangen und etwa 1/2 Stunde nach der Blutentnahme zentrifugiert. Das noch nicht ganz klare Plasma wird abgehebert und nach 2—2½ Stunden abermals zentrifugiert. Wichtig ist, daß die Berührung von Plasma und Formelementen des Blutes nur kurze Zeit andauert. Das klare Plasma wird nun mit dem gleichen Volumen gesättigter, kalkfreier Kochsalzlösung versetzt. Der entstehende, gallertige Niederschlag wird durch Zentrifugieren während 15 Minuten zusammengeballt, mit dem Glasstab herausgenommen und mit Filtrierpapier abgepreßt. Nach möglichster Befreiung von Flüssigkeit wird er in Wasser gelöst. Die ihm noch beigemengten Salzmengen genügen zur Lösung. In der neuen Lösung wird die Fällung durch Halbsättigung mit Kochsalz wiederholt. Der jetzt entstehende Niederschlag setzt sich sofort zäh am Boden ab. Man preßt ihn in wenigen Augenblicken am Boden des Gefäßes zusammen, nimmt ihn dann heraus und löst ihn abermals ohne Verlust in Wasser. Auch diese Prozedur wird wiederholt. Schließlich resultiert eine bläuliche, opalisierende Lösung von reinem Fibrinogen.

Was die Ausbeuten an Fibrinogen betrifft, so kann man bei schnellem Arbeiten und bei der Verwendung großer Blutplasmamengen zu etwa 1%igen Fibrinogenlösungen gelangen. Die Ausbeute nimmt erheblich mit der Reinigung ab, so daß die Lösungen oft auf einen Gehalt von 0·1—0·3%

[1]) *W. Huiscamp*, Bemerkungen zur Fibrinoglobulinfrage. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**, S. 273 (1905).

Fibrinogen herabsinken und selbst dabei noch 3—5% NaCl als Asche enthalten. Natürlich ist auch die Reinheit von der Natur des Ausgangsmaterials abhängig. Fibrinogen aus Transsudaten ist bisher wohl noch kaum ganz lecithinfrei dargestellt worden.

Eigenschaften. Fibrinogen hat die allgemeinen Eigenschaften der Globuline. Es ist in feuchtem Zustand elastisch, zäh, klumpig zusammenballend. Lösungsmittel sind verdünnte Salzlösungen und Alkalien. Fällungsmittel sind u. a. Kohlensäure und verdünnte Säuren sowie Neutralsalze. Die Fällung durch Magnesiumsulfat und Kochsalz ist schon vor Halbsättigung beendet. Die untere Fällungsgrenze des im Plasma gelösten Fibrinogens gegen gesättigte Ammonsulfatlösung beträgt 1·5—1·7, die obere Sättigungsgrenze 2·5—2·7 bei Fällung von 2 *cm*³ Blutplasma in dem Gesamtvolum von 10 *cm*³ Flüssigkeit (Plasma + Wasser + gesättigter Am_2SO_4-Lösung).

Calciumchlorid erzeugt in ganz schwach alkalischer, salzfreier Lösung einen Niederschlag, der in Salzen und im Überschuß des Kalksalzes löslich ist.

Reine Fibrinogenlösungen gerinnen nicht spontan, sondern bleiben tagelang flüssig. Die Koagulationstemperatur liegt bei einem Kochsalzgehalt der Lösung von 5—10% bei 52—55°, bei einem Salzgehalt unter 2% bei 56°.

Quantitativ wird es auskoaguliert durch Erwärmen auf 58° während 5 Minuten. Ein Fibrinogen aus Krebsblut koaguliert bei 65°.

$(\alpha)_D = -52·5$ für Pferdefibrinogen, $(\alpha)_D = -36·8$ für Rinderfibrinogen. Als mittlere Zusammensetzung wird angegeben: C 52·93, H 69, N 16·66, S 1·25, O 22·26%. Der Schwefelgehalt beträgt nach *Mörner* 1·13% mit 0·46% leicht abspaltbarem Schwefel.

Vorkommen. Fibrinogen findet sich: im Blutplasma, Blutserum, auch niederer Tiere, der Chyluslymphe, in einigen Trans- und Exsudaten, im Knochenmark, in lymphoiden Organen und in der Vesicula seminalis des Meerschweinchens.

Qualitativer Nachweis. Auf das Vorhandensein von Fibrinogen kann überall da geschlossen werden, wo Spontangerinnungen von tierischen Gewebsflüssigkeiten vorkommen, oder wo solche Gerinnungen durch Zusatz von Fibrinferment oder fermenthaltiger Flüssigkeit (frisches Blutserum) zu erzielen sind. Nur die Spontangerinnung von myosinhaltigen Flüssigkeiten kann zu Verwechslungen führen. Für Fibrinogen entscheidet der Fermentversuch und die Koagulationstemperatur.

Qualitative Probe durch Fibrinfermentwirkung.

Man prüft zweckmäßig so, daß man eine Probe der Gewebsflüssigkeit oder eines Organextraktes in physiologischer Kochsalzlösung der Spontangerinnung überläßt und zu einer anderen Probe eine aliquote Menge frischen, vom Fibrin durch Schlagen befreiten und filtrierten Blutserums setzt (siehe unten). Die Proben werden bei 35° während 12 Stunden belassen und nachher auf das Vorhandensein von Fibrin geprüft.

Zur Ausführung dieser an sich wenig sicheren Probe ist die Anwendung größerer Mengen Gewebsflüssigkeit (bis zu 100 *cm*³) nötig.

Eine zweite Probe liegt in der Prüfung der Koagulationstemperatur. Das Auftreten einer Trübung in der Lösung bei 52—55° spricht für das Vorhandensein von Fibrinogen. In nicht zu komplizierten Eiweißgemischen ist die Probe verwertbar, natürlich unter Anwendung aller Kautelen, die einer Koagulationstemperaturbestimmung die Objektivität garantieren (siehe hierzu S. 349).

Die Methode der Darstellung nach *Reye* gestattet auch den Fibrinogennachweis im Blutserum.

Fibrin ist ein wasserunlösliches Umwandlungsprodukt des Fibrinogens und entsteht aus diesem unter dem Einfluß des Fibrinfermentes.

Darstellung von Rohfibrin aus Blutplasma. Als Ausgangsmaterial wählt man große Mengen frischen Pferdeblutes. Für die Isolierung möglichst zellfreien, reinen Fibrins empfiehlt sich die Verarbeitung von fibrinogenhaltigen Transsudaten oder von Oxalatplasma, aus dem man die Oxalsäure mit Ca-Salzen entfernt. Während des Gerinnungsprozesses werden größere Mengen frisch aufgefangenen Blutes mit einem rauhen Holzstabe, Fischbeinstäben oder einem Drahthaarpinsel energisch geschlagen. Das Fibrin scheidet sich dabei als fadige, elastische Strähne ab. Mit der Fortdauer dieser Prozedur wird es immer fester und kohärenter. Schließlich entfernt man die Fibrinmassen, die sich um das Instrument, mit dem man das Schlagen bewirkt hat, aufgewickelt haben, manuell und extrahiert sie unter häufigem Umrühren und Durchkneten tagelang mit großen Mengen häufig erneuerten Wassers. Mit zunehmender Reinigung und Entfärbung wird das Fibrin schneeweiß, verliert aber unter Quellung erheblich an Elastizität. Der ersten Extraktion mit Wasser läßt man eine Extraktion mit physiologischer und mit 10%iger Kochsalzlösung folgen. Hierauf extrahiert man abermals mit Wasser und schließlich 3 Tage lang mit 0·02% Ammoniak (zur Befreiung von Fibrinoglobulin!). Die ganze Fibrindarstellung muß bei niederer Temperatur vorgenommen werden, um Fäulnisprozesse zu vermeiden.

Für Verdauungsversuche kann man das Rohprodukt des Fibrins verwenden. Zum Zweck der Reindarstellung aber müssen alle Extraktionen peinlich durchgeführt werden. Zuletzt denaturiert man durch Behandeln mit Alkohol oder durch Erhitzen auf 75°, wodurch das Fibrin an Dehnbarkeit und Diaphanität seiner Farbe verliert. Man verdrängt zuletzt den Alkohol mit Äther und trocknet im Vakuum.

Reindarstellung kleiner Fibrinmengen nach *Heubner* (l. c. S. 364, Note 3). Man fängt das Pferdeblut in soviel Kochsalzlösung auf, daß eine Lösung von 60% Blutplasma mit 4% Kochsalz entsteht. Alsdann werden die Blutkörperchen durch energisches Zentrifugieren beseitigt. Man verdünnt nun mit Wasser derart, daß ein Gerinnungsoptimum hergestellt wird. Alsdann versetzt man die Lösung mit soviel Ammoniak, daß die Lösung einen NH_3-Gehalt von 0·0014% gewinnt und rührt das Ganze sofort mit dem mechanischen Rührer im kalten Kellerraum durch. Nach 48 Stunden ist die Gerinnung beendet. Die Fibrinfäden finden sich um das Rührwerk

gewickelt, von dem sie leicht mechanisch entfernt werden können. Sie werden hierauf fein zerschnitten, mit 10%iger Kochsalzlösung bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gewaschen, mit Wasser salzarm gewaschen und bei 110° getrocknet.

Ebenso reines Fibrin läßt sich natürlich durch Zusatz von Fibrinferment oder fermenthaltigem Material zu den oben beschriebenen Fibrinogenlösungen darstellen. Es scheidet sich dann das Fibrin in feinen Fäden ab, die sich leicht am Glasstab fixieren lassen und dann kurz mit verdünnter NaCl-Lösung oder direkt mit heißem Wasser und Alkohol und Äther behandelt werden.

Beurteilung: Keine der eben genannten Isolierungsmethoden garantiert die Gewinnung eines unveränderten Fibrins im strengsten chemischen Sinne. Die ausgedehnten Extraktionen zur Befreiung von morphologischen Elementen oder von Fermenten bedingen zumeist eine partielle Denaturierung des Fibrins oder eine Spaltung, sind also nicht absolut indifferent.

Eigenschaften. Fibrin steht in seinen Löslichkeitsverhältnissen den koagulierten Eiweißkörpern sehr nahe, unterscheidet sich aber von ihnen durch seine relativ leichte Veränderlichkeit durch Salzlösungen. Die Eigenschaften der Elastizität und des physikalischen Verhaltens sind von dem Aggregatzustand, d. h. von seiner Dichte außerordentlich abhängig. Mit Salzbehandlung oder Alkoholbehandlung geht die Elastizität unter gleichzeitiger Schrumpfung verloren, im Kontakt mit Wasser kehrt sie partiell unter Quellung wieder. In HCl oder NaOH quillt Fibrin gallertig auf. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Änderung der äußeren physikalischen Eigenschaften die Begleit- oder Folgeerscheinung einer chemisch molekularen Veränderung des Fibrins ist.

Mittlere Elementarzusammensetzung: C 52·68, H 6·83, N 16·91, S 1·10%. Koagulationstemperatur 75°.

Qualitativer Nachweis. Niederschläge in Gestalt von Fetzen oder Flocken, die in Gewebsflüssigkeiten vorkommen, werden durch Aufschlemmen in Wasser und Waschen mit 5—10%iger thymolisierter Kochsalzlösung von anderen Proteinen befreit. Man prüft dann das Verhalten gegen 0·1% Salzsäure (Quellung!) oder die leichte Verdaulichkeit durch Pepsinsalzsäure (Magensaft). In der Wärme geht der Körper zum Teil in eine Lösung, welche die Eiweißfarbenreaktionen gibt, über.

4. Fibrinoglobulin galt bald als ein im Blutplasma präformiertes Globulin, bald als ein aus dem Fibrinogen beim Übergang in Fibrin neben diesem entstehendes Protein *(Schmiedeberg, Heubner)*. Mit allergrößter Wahrscheinlichkeit besteht die erstgenannte Auffassung zurecht (vgl. l. c. S. 364, Note 3, S. 365, Note 1 und S. 366, Note 1).

Das Fibrinoglobulin findet sich im Serum. Wegen seiner gleichen Eigenschaften gegen die fällende Wirkung von Kochsalz ist in allen nach *Hammarsten* aus Blutplasma bereiteten Fibrinogenlösungen das gesamte Fibrinoglobulin des Plasmas enthalten. Die Trennung beider Körper mit

Hilfe der Fällung durch Natriumfluorid (vgl. bei Fibrinogen) gelingt nur insofern, als man globulinfreies Fibrinogen darstellen kann, aber kein fibrinogenfreies Globulin, da die Fällung des Fibrinogens mit NaF keine quantitative ist.

Darstellung von Fibrinoglobulin aus Fibrinogenlösungen nach *Hammarsten.*[1]) Man löst das genuine Fibrinogen in verdünnter Kochsalzlösung und bringt dasselbe durch Zusatz von Ferment oder fermenthaltiger Lösung oder auch durch partielles Erwärmen auf 56° als Fibrin- bzw. Fibrinogenkoagulat zur Ausfällung. Das Filtrat dieses Niederschlags enthält das Fibrinoglobulin, das man entweder durch weiteres Erhitzen der Lösung auf 64° in denaturierter oder durch Sättigen der Lösung mit Kochsalz in genuiner Form zur Abscheidung bringt. Statt Kochsalz kann man auch Ammonsulfat verwenden. Die Fällungsgrenze des Fibrinoglobulins liegt bei 28% Salzsättigung. Die Fällung wird in der für Globuline üblichen Weise gereinigt (Umfällung, Dialyse, Alkoholfällung).

Die Darstellung aus spontan von Fibrinogen befreiten Lösungen, d. h. aus Blutserum, erfolgt in ganz derselben, eben beschriebenen Weise.

Die Elementaranalyse ergab die Werte: C 52·70, H 6·98, N 16·06%. Koagulationstemperatur 64—66°.

Der qualitative Nachweis ergibt sich aus den hier geschilderten Darstellungsmethoden. Die Koagulationstemperatur von 64—66° ist für das fibrinogenfreie Fibrinoglobulin charakteristisch, natürlich nur dann, wenn die in Frage kommende Eiweißlösung frei von Muskeleiweißkörpern ist. Da aber Fibrinoglobulin stets neben Fibrinogen vorkommt, so überzeugt man sich zuerst von der Anwesenheit des letzteren durch einen Fermentversuch mit reinem Fibrinferment.

5. Nukleoproteid aus Blutserum.

Ein von *Pekelharing* im Rinderblutserum entdecktes Nukleoproteid wird heute zweckmäßig nach Angaben von *Huiscamp*[2]) oder von *Liebermeister*[3]) isoliert. Der Körper scheint mit einem Proteid identisch, das *Freund* und *Joachim* (l. c. S. 361, Note 1) bei der Aufteilung der Serumglobuline von Mensch, Pferd und Rind fanden und als Nukleoproteid bezeichnen (vgl. hierzu Serumglobulin, S. 357 f.).

Zur Darstellung dieses Körpers müssen große Mengen Serum verwendet werden, da derselbe normalerweise höchstens zu 0·15—0·2‰ in ihm enthalten ist.

1 Volumen Rinderblutserum wird mit 2 Volumen Wasser verdünnt und alsdann mit verdünnter Essigsäure bis zu deutlich saurer Reaktion versetzt.

[1]) *O. Hammarsten,* Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fibrinbildung. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 28. S. 98 (1899). — Derselbe, Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 22. S. 333 (1896). — Ferner *Malys* Jahresb. 1882. S. 11.

[2]) *W. Huiscamp,* Über die Eiweißkörper der Thymusdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32. S. 191 (1901).

[3]) *G. Liebermeister,* Über das Nukleoproteid des Blutserums. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 8. S. 439 (1906).

Der entstehende flockige Niederschlag, bestehend aus Globulin und Nukleoproteid, wird nach dem Absetzen dekantiert und auf ein Filter gebracht. Alsdann wird der Filterrückstand mit möglichst wenig Ammoniak in Wasser gelöst. Nach dem Filtrieren dieser das Proteid enthaltenden Lösung wird durch Zusatz einer Lösung von Calciumchlorid eine Fällung erzeugt. Der entstehende Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, mit Wasser nach Zusatz von 2 Tropfen Ammoniak gelöst, filtriert und nochmals mit Calciumchlorid gefällt. Der jetzt entstehende Niederschlag wird auf dem Filter mit Alkohol so lange gewaschen, bis der abfließende Waschalkohol kein Calciumchlorid mehr enthält. Hierauf bringt man den Niederschlag unter Äther und läßt ihn schließlich lufttrocken werden.

Das so dargestellte Proteid enthält 1·853% Asche, 0·639% Kalk und nur wenig Phosphor.

Ob der Körper ganz rein von Globulinbeimischungen darstellbar ist, bleibt zweifelhaft. Er ist wie durch $CaCl_2$ auch durch $BaCl_2$ und $MgSO_4$ fällbar. Im Überschuß des $CaCl_2$ ist er nicht ganz unlöslich, daher ist bei der Fällung mit diesem Salz ein Überschuß zu vermeiden.

Methode nach *Liebermeister*.[1])

Je 1 *l* Pferdeblutserum wird mit 20 *l* Wasser verdünnt. In diese Lösung wird Kohlensäure eingeleitet. Es entsteht eine Trübung, die sich bald zu Boden setzt. Sie besteht aus Euglobulin und dem gesuchten Nukleoproteid. Man hebert die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit ab, zentrifugiert den feuchten Niederschlag in flachen Zentrifugiergläsern scharf ab. Nun setzt man zu dem am Boden des Gefäßes befindlichen Niederschlag vorsichtig die 5fache Menge einer 1%igen Kochsalzlösung unter Überschichtung zu und läßt ruhig stehen. Meist nach 6 Stunden ist der größte Teil des Niederschlags (das Globulin) in Lösung gegangen. Nach vorsichtigem Abgießen dieser Lösung hinterbleibt ein glasiger, schleimiger fadenziehender Bodensatz. Dieser wird in 1%iger Kochsalzlösung nach Zusatz einer ausreichenden Spur von Natriumkarbonat gelöst, und aus der Sodalösung mit wenig verdünnter Essigsäure gefällt. Nach einigem Stehen wird der flockige Niederschlag abfiltriert, auf dem Filter durch Übergießen mit absolutem Alkohol koaguliert und schließlich mit heißem Wasser gewaschen. Nachdem der Filterrückstand lufttrocken ist, wird er im Soxhletapparat zur Befreiung von Fett und Cholesterin 12 Stunden lang mit Alkohol und mehrere Tage mit Äther extrahiert. Die Behandlung mit Äther ist so lange fortzusetzen, bis eine Probe des Ätherextraktes keinen phosphorhaltigen Rückstand mehr hinterläßt. Dann folgt eine zehnstündige Extraktion mit Chloroform und Trocknen bei 100°.

Die Ausbeuten betragen etwa 2·5 *g* aus 15 *l* normalem Blutserum des Pferdes. In pathologischen Fällen (septische Eiterungen) kann die Aus-

---

[1]) *G. Liebermeister*, Über das Nukleoproteid des Blutserums. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 8. S. 439 (1906).

beute auf 2⁰/₀₀ steigen. Die krankhaften Vermehrungen des Proteidgehaltes sind noch nicht eingehend studiert worden.

Eigenschaften: Der Körper hat im allgemeinen die Eigenschaften eines Nukleoproteids. Er ist löslich in Soda und fixen Alkalien sowie in einem großen Überschuß von Essigsäure. Er ist unlöslich in Wasser, 1⁰/₀iger Kochsalzlösung und verdünnter Essigsäure. Seine Zugehörigkeit zu dieser Gruppe der Proteide ist weniger durch seinen relativ niederen Phosphorgehalt, als durch den Gehalt von Nuklein- bzw. Purinkörpern bewiesen. Diese werden durch Behandeln mit kochender 10⁰/₀iger Salzsäure während 4 Stunden abgespalten und sind mit ammoniakalischer Silbernitratlösung fällbar.

Von den Eiweißfarbenreaktionen fehlt die Reaktion nach *Hopkins-Adamkiewicz*. Die mittlere Elementarzusammensetzung wurde gefunden zu:

C 51·65, H 7·24, N 13·88, P 0·079, S etwa 1·0, Asche 0·33⁰/₀.

Das Nukleoproteid im Blutplasmaniederschlag (*Bang*[1]).

Man zentrifugiert Blut (am besten Pferdeblut), dem man 0·3⁰/₀ Ammoniumoxalat zugesetzt hat. Das Plasma wird abgetrennt und filtriert. Nach 48stündigem Stehen im Eisschrank hat sich ein Niederschlag gebildet, der durch Zentrifugieren gesammelt wird. Man löst denselben nach Möglichkeit in Wasser — ein Teil bleibt ungelöst —, filtriert und gewinnt durch Zusatz von $CaCl_2$ oder wenig verdünnter Essigsäure eine reichliche Fällung. Dieser entstehende Säureniederschlag wird abzentrifugiert, in wenig 0·01⁰/₀iger Natronlauge gelöst. Die meist zuerst schleimige Lösung wird nach einiger Zeit klar und dann flüssig unter Zusammenballen des Niederschlags als Schleimflocken. Diese Flocken wickelt man um einen Glasstab und löst sie in 0·5⁰/₀iger HCl. Dabei geht ein Teil durch Spaltung des ursprünglichen Nukleoproteids in ein lösliches Albuminat in Lösung. (Die Identifikation desselben vergleiche bei Thymusproteid.) Inwieweit dieser Körper im Plasma oder Serum präformiert ist, ist nicht entschieden. Jedenfalls dürfte er mit dem Proteid *Liebermeisters* nicht identisch sein. Der beim Stehen ausfallende Niederschlag ist sehr reich an Prothrombin (vgl. hierzu Darstellung von Fibrinogen und Fibrinferment).

6. Serummukoid nach *Zanetti*.[2])

1200 *cm*³ Blutserum vom Rind werden mit 2 Volumen einer 1·5⁰/₀igen Kochsalzlösung versetzt. Aus dieser Lösung entfernt man das Albumin und Globulin durch Auskoagulieren in der Hitze nach Zusatz der geeigneten Menge Essigsäure (vgl. Kapitel: Enteiweißung). Das klare Filtrat wird im Vakuum bis 45⁰ auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Alkohol gefällt. Der entstehende, etwas gefärbte Niederschlag wird wiederholt auf dem Filter mit Alkohol und Äther ausgewaschen, bis er nahezu farblos ist.

[1]) *J. Bang*, Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe. III. Mitteilung. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **4**. S. 362 (1904).

[2]) *C. U. Zanetti*, Über das Ovomukoid und über ein neues Glykoproteid des Blutserums. Ann. di Chim. e di Farm. Vol. **26**. p. 12 (1897). — Vgl. hierzu auch *H. W. Bywaters*, Über Seromukoid. Biochemische Zeitschr. Bd. **15**. S. 322 (1909).

Dann löst man wieder in Wasser und dialysiert die Lösung gegen laufendes und gegen destilliertes Wasser. Das Dialysat engt man wieder auf ein kleines Volumen ein und fällt mit Alkohol. Lösung und Fällung dieser Art werden 3—4mal wiederholt. Der zuletzt abfiltrierte Niederschlag wird im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Der resultierende Körper ist ein meist noch gelbliches und leicht hygroskopisches Pulver.

Elementarzusammensetzung C 47·60, H 7·10, N 12·93, S 2·38, Asche 0·3%. (Über die Eigenschaften vgl. Kapitel Mucinsubstanzen.)

Methoden zur quantitativen Bestimmung der hier genannten Proteine im Blutserum und in anderen serösen und eiweißhaltigen Flüssigkeiten.

Da es sich bei den folgenden Methoden im wesentlichen um die Bestimmung von Globulinen neben Albuminen handelt, so sind die am Blutserum als brauchbar erprobten Methoden auch für andere Proteinlösungen anwendbar, also für Transsudate und Exsudate oder eiweißhaltigen Harn.

1. Bestimmung des Gesamteiweißgehalts durch direkte Wägung: Man fällt das Eiweiß aus einer abgewogenen oder abgemessenen Blutserum- oder Blutplasmamenge (20—50 *cm*³), die durch Zentrifugieren und Filtrieren vollkommen geklärt ist, mit dem 4fachen Volumen Alkohol aus, läßt die Mischung mehrere Stunden stehen und bringt dann den Niederschlag auf ein trocken gewogenes, aschefreies Filter. Auf dem Filter wäscht man mit heißem Alkohol, Äther, dann wieder mit Alkohol und zuletzt mit kochendem Wasser sorgfältig aus. Dieser Filterrückstand enthält die in Wasser bzw. Alkohol unlöslichen Proteine und Salze, bisweilen Spuren von Farbstoffen. Man entfernt die letzten Wasserspuren durch Nachwaschen mit Alkohol und trocknet im Wärmeschrank (Temperatur bis auf 120° gesteigert). Nachdem man gewogen hat, verascht man und zieht die nach der Veraschung verbleibende Aschemenge von dem Gewicht des Filterrückstandes ab. Der gefundene Wert bezeichnet die Proteinmenge. (Kleine Mengen Proteine gehen nicht selten beim Auswaschen in die wässerig alkoholische Lösung über, weshalb der hier gefundene Wert etwas zu klein ausfällt.)

Beurteilung: Diese Methode der Alkoholfällung gestattet die Bestimmung auch der unkoagulablen Proteine, also der Mukoide, Nukleoproteide und einiger Albumosen. Ist man durch qualitative Vorproben darüber orientiert, daß die in Frage kommende eiweißhaltige Lösung, z. B. Harn, albumosenfrei ist, so kann man das Gesamteiweiß auch durch Koagulieren nach einer der auf S. 373 und 374 angegebenen Methoden bestimmen.

2. Quantitative Bestimmung der koagulablen Proteine (Albumin + Globulin + Fibrinogen im Serum, Albumin + Globulin im Harn) in serösen Flüssigkeiten. Man erhitzt 50—100 *cm*³ Wasser in einer Porzellanschale oder in einem Becherglas zum gelinden Kochen und läßt aus einer Pipette 15—20 *cm*³ der zu untersuchenden, klar filtrierten Flüssigkeit langsam in die kochende Lösung zufließen. Dann erhält man einige

Minuten im Sieden, während dessen man solange aus einer Kapillarpipette verdünnte Essigsäure zufließen läßt, bis die Gerinnung grobflockig und die Flüssigkeit klar erscheint. Bei diesem Sieden der Lösung hat man sorgfältig darauf zu achten, daß nicht Koagulate am Boden haften und etwa festkleben und verbrennen können. Man kann, um dies zu vermeiden, den Säurezusatz auch vornehmen, während die Fällungsmischung auf dem kochenden Wasserbad steht. Bisweilen gibt sich der Punkt der quantitativen Ausflockung, d. h. der Punkt des optimalen Säuregehaltes auch daran zu erkennen, daß sich der Niederschlag plötzlich in Form einer gröberen Flockenmasse zu Boden senkt. Man filtriert alsdann noch heiß auf ein trocken gewogenes, aschefreies Filter, indem man zugleich Sorge trägt, daß die Koagulatflocken nirgends am Glas antrocknen können. Gibt das klar ablaufende Filtrat noch eine deutliche Fällung mit Ferrocyankalium und Essigsäure, so ist die Bestimmung zu verwerfen. Man führt dann besser eine neue Bestimmung aus. Ist die Flockung gut gelungen, so muß das Filtrat leicht und wasserklar ablaufen und darf nicht schäumen. Den Filterrückstand wäscht man gut mit heißem Wasser, heißem Alkohol und Äther aus und trocknet zur Gewichtskonstanz bei 120°. Dann verascht man und bringt das Gewicht der Asche von dem Gewicht des getrockneten Niederschlages in Abzug.

Die Bestimmung in serösen Flüssigkeiten geschieht in der gleichen Weise.

3. Quantitative Bestimmung von Albumin und Globulin im Blutserum und in serösen Flüssigkeiten (S. 361, Note 3).

Man mißt oder wiegt 20—50 cm^3 klarer Flüssigkeit ab und fügt zu derselben das gleiche Volumen einer neutralen, gesättigten Ammonsulfatlösung hinzu. Nach einstündigem Stehen hat sich der gebildete Niederschlag abgesetzt. Längeres Stehenlassen erleichtert die folgende Filtration. Nunmehr filtriert man durch ein aschefreies, gewogenes Filter quantitativ ab und wäscht den Filterrückstand solange mit dieser halbgesättigten Ammonsulfatlösung aus, bis eine kleine Probe der abfließenden Flüssigkeit keine Trübung mit Ferrocyankalium + Essigsäure gibt. Der Niederschlag enthält die Globuline und eventuell bei Verarbeitung von Plasma Globuline + Fibrinogen. Das gesamte Filtrat enthält das Albumin.

Aus dem Filtrat fällt man das Albumin, indem man die Lösung zum Sieden erhitzt und mit Essigsäure in der sub 2 beschriebenen Weise fällt. Die Weiterverarbeitung (Filtration, Auswaschen mit heißem Wasser, Entwässern, Trocknen, Wägen, Veraschen, Wägen) geschieht ganz in der dort beschriebenen Weise.

Der Globulinniederschlag wird einige Zeit zur Koagulation auf 110° im Luftbad erhitzt, dann mit kochendem Wasser von Salzen, mit Alkohol von Wasser und mit Wasser von Alkohol befreit. Hierauf trocknet man bei 120° im Luftbad zur Gewichtskonstanz, verascht quantitativ und zieht den gefundenen Aschewert von dem Wert des getrockneten Niederschlages ab.

Führt man diese Bestimmung am eiweißhaltigen Harn aus, so verwendet man 50—100 *cm*³ klar filtrierten Harn, den man vorher mit verdünntem Ammoniak bis zum Verschwinden der sauren Reaktion versetzt hat. Im übrigen befolgt man die vorangehenden Vorschriften.

4. Bestimmung von Fibrinogen, Albumin und Globulin im Blutplasma[1]) (l. c. S. 362, Note 1).

Frisch aus dem Gefäß entnommenes Blut läßt man in ein mit 3⁰/₀iger Fluornatriumlösung beschicktes Gefäß laufen. Man verwendet soviel der Salzlösung, daß eine 0·5—0·6⁰/₀ige Fluornatriumplasmalösung entsteht. Statt dieses frischen Plasmas kann natürlich auch etwas Oxalatplasma verarbeitet werden. 100 *cm*³ des Fluoridplasmas werden mit 25 *cm*³ destilliertem Wasser und 13·4 *cm*³ gesättigter neutraler Ammonsulfatlösung versetzt. Der sich beim Stehen in der Kälte bald abscheidende Fibrinogenniederschlag wird auf ein gewogenes Filter quantitativ abfiltriert (Fibrinogen I). Der Niederschlag wird mit entsprechend verdünnter Ammonsulfatlösung solange gewaschen, bis das Filtrat auch keine Spur einer Trübung beim Zusatz von Essigsäure + Ferrocyankalium und keine mit Baryumchlorid nachweisbare Schwefelsäure mehr enthält. Der dann mit Alkohol und Äther nachgewaschene Niederschlag wird bei 105⁰ zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Das Filtrat des Fibrinogens, mit allen Waschwässern vereinigt, wird nun mit soviel gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, daß das Gesamtvolumen eine Halbsättigung mit Ammonsulfatlösung erhält. (Über die Berechnung bei der Verwandlung einer Sättigung von $\frac{a}{b}$ in eine solche von $\frac{a_1}{b_1}$-Sättigung siehe Seite 355.) Das bei der Halbsättigung ausfallende Globulin wird, wie sub 3 beschrieben, verarbeitet und schließlich gewogen. Das im Filtrat der Globuline bleibende Albumin wird nach dem sub 2 geschilderten Verfahren auskoaguliert und zur Wägung vorbereitet.

Beurteilung: Ob diese Art der Fibrinogenbestimmung eine quantitative ist, bleibt vorläufig unentschieden. Jedenfalls aber gibt sie bei mehreren Reihenversuchen relative Zahlenwerte. Die Methode ist außer für Blutplasma auch für vergleichbare Organ- und Knochenmarkextrakte anwendbar.

5. Isolierte Fibrinogenbestimmung. Man bringt die aus dem Fibrinogen durch Fibrinferment gebildete Fibrinmenge zur Wägung und setzt den gefundenen Fibrinwert als Näherungswert der vorhandenen Fibrinogenmenge gleich.

Als fibrinfermenthaltige Lösung benutzt man frisches Blutserum, das man aus Blutplasma durch Schlagen von Fibrin befreit. Von dem ausgeschiedenen Fibrin filtriert man durch ein Leintuch ab und zentrifugiert zur Klärung. Nun setzt man zu 50—100 *cm*³ der fraglichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeit, die man in ein Becherglas genau abmißt, die gleiche

---

[1]) *L. Langstein* und *M. Mayer*, Über das Verhalten der Eiweißkörper des Blutserums bei experimentellen Infektionen. *Hofmeisters* Beitr. Bd. 5. S. 69 (1904).

Menge dieses frischen fermenthaltigen Blutserums. Zugleich stellt man mehrere Kontrollproben mit steigenden Mengen des Serumzusatzes an, um in jedem Fall auch zur Fibrinbildung ausreichende Fermentmengen zuzusetzen. Nachdem man die Mischung 24 Stunden bei 20—30° belassen hat, bringt man durch Schlagen mit einem Glasstab das ausgeschiedene Fibrinnetz zum Zusammenballen, sammelt den Niederschlag auf einem gewogenen Filter, wäscht dann aufeinander folgend mit 1%iger NaCl-Lösung, Wasser, heißem Alkohol und Äther und trocknet vor der Wägung bei 120° zur Gewichtskonstanz.

Die Fibrinmengen müssen in den verschiedenen Kontrollproben die gleichen sein, wenn die Fibrinogenumwandlung wirklich quantitativ abgelaufen ist.

6. Quantitative Bestimmung von Fibrin aus Blutplasma und Blut.

In ein kleines Becherglas von 100 cm^3 Inhalt reicht ein ruderförmiges Fischbeinstäbchen, das durch eine das Becherglas abschließende Gummikappe durchgesteckt ist (Fig. 41). Das so vorbereitete Glas wird trocken gewogen. In dasselbe fängt man direkt aus dem Blutgefäß 10 bis 40 cm^3 Blut auf. Zur Bestimmung in Plasma wird eine abgemessene Menge des auf Eis aufbewahrten Plasmas verwandt.

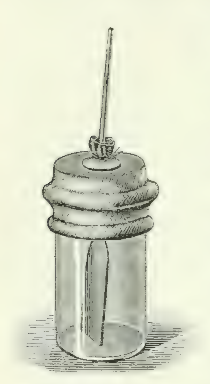


Fig. 41.

Nach vollständigem Verschluß mit der Kautschukkappe schlägt man das Blut etwa 10 Minuten lang durch schnellende Bewegungen des Fischbeinstäbchens, natürlich ohne Lockerung des die Verdunstung verhindernden Kautschukverschlusses. Nunmehr wird der ganze gefüllte Apparat zur Bestimmung des Blutgewichts kalt gewogen. Hierauf öffnet man und füllt das Glas fast vollständig mit Wasser an, rührt kräftig um und wartet, bis sich die Fibrinflocken zu Boden gesetzt haben. Hierauf gießt man das überstehende Wasser vorsichtig ab, ersetzt es durch neues, dem einige Tropfen Kochsalzlösung zugesetzt sind und rührt aufs neue gut um. Nach dem Absetzen trennt man die oberen klaren Flüssigkeitsmengen wiederum durch Abgießen und fährt mit diesem Dekantieren solange fort, bis das Fibrin hell und vor allem die über ihm stehende Flüssigkeit fast farblos geworden ist. Erst dann spült man das Fibrin quantitativ auf ein kleines gewogenes Filter. Die an dem Stäbchen haftenden Fibrinfasern werden mit einer Pinzette gleichfalls auf das Filter übertragen. Dann wäscht man das Fibrin mit NaCl-haltigem Wasser bis zur Farblosigkeit oder nur noch Hellrosafärbung, übergießt dann zur Entfernung von Fetten und Extraktivstoffen mit siedendem Alkohol und Äther und trocknet das Ganze bei 110—120°. Nach dem Trocknen und Abkühlen im Vakuum wägt man.

Verarbeitet man das Blut von Vögeln, Amphibien oder Fischen, so verwendet man als Waschflüssigkeit besser eine 1—3%ige Lösung von Natriumsulfat an Stelle einer Kochsalzlösung.

Beurteilung: Die Methode liefert nur Annäherungswerte, ist aber zur Bestimmung relativer Fibrinmengen gut verwertbar. Sie läßt sich bei richtigem Waschen durch ergiebiges Dekantieren, von der Trocknungszeit abgesehen, in wenigen Stunden beenden. Die Resultate werden nicht durch das Phänomen der Fibrinolyse fehlerhaft beeinflußt.

II. Die Eiweißkörper des Vogeleies.

Im Weißen des Hühnereies kommen vor: Ovalbumin, Konalbumin, Ovoglobulin und Ovomukoid.

Im Gelben des Eis, d. h. im Eidotter, sind vorhanden die Viteline.

Als Eihüllen kommen vor: Albumoide (Ovokeratin) und Mukoide.

Proteine des Eierweißes:

1. Ovalbumin vgl. das Kapitel der kristallisierenden Proteine, S. 335. Die Menge beträgt etwa 50% der Eiweißproteine.

Konalbumin. Mit diesem Namen bezeichnet man ein nicht kristallisierendes Albumin, das angeblich ein vom Ovalbumin verschiedenes Albumin sui generis darstellt.

Darstellung aus Eierweiß (*Langstein*[1]).

Man verwendet die Mutterlaugen des durch Kristallisation abgeschiedenen Ovalbumins. Zu diesem Zweck befreit man Eierklar durch Schlagen von seinen Membranen und versetzt das klare Filtrat mit dem gleichen Volum einer gegen Lakmoid absolut neutral reagierenden, gesättigten Ammonsulfatlösung. Man filtriert von dem Niederschlag, der das Ovoglobulin enthält (siehe unten), ab und kristallisiert aus dem Filtrat das Ovalbumin nach einer der vorbeschriebenen Methoden aus. Nachdem sich aus der Mutterlauge auch nach Wochen keine Albuminkristalle mehr abscheiden, wird die filtrierte Lösung gegen fließendes Wasser bis zur fast vollständigen Entfernung der Schwefelsäurereaktion dialysiert und hierauf bei 50—60° auf dem Wasserbade erhitzt. Hierbei scheiden sich die Reste von Albumin aus, die aus unbekannten Gründen der Kristallisation entgangen sind. Nach dem Abfiltrieren derselben erhitzt man die Lösung höher bis auf 90° und erhält das Koagulat des Konalbumins. Dasselbe wird abfiltriert, tagelang bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion und dem Versagen einer Phosphorwolframsäurefällung im Filtrat mit heißem Wasser gewaschen und schließlich bei 110° getrocknet.

Nach anderer Methode haben *Osborne* und *Campbell*[2]) ein Konalbumin dargestellt.

---

[1]) *L. Langstein*, Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **1**. S. 82 (1902).

[2]) *Th. B. Osborne* und *G. F. Campbell*, Die Proteinbestandteile des Eiereiweißes. Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. **22**. p. 422 (1900). — Rep. Connecticut Agricult. exp. Station. Vol. **23**. p. 348 (1900).

Beurteilung: Ob dieser Körper ein einheitliches spezifisches Protein darstellt, ist unbestimmt. Es besteht immer die Möglichkeit, daß Beimengungen eines dritten, ovomukoidartigen Körpers die Kristallisation dieser Fraktion verhindern, seine veränderte Salzfällbarkeit, spezifische optische Drehung und seine verschiedene Elementarzusammensetzung bedingen.

Zusammensetzung des Ovalbumins, kristallisiert	C	H	N	S	(α)D
Osborne und *Campbell*	52·82	7·03	15·32	1·59	—29—30°
Langstein	52·46	7·19	15·29	1·34	
des Konalbumins					
Osborne und *Campbell*	52·25	6·99	16·11	1·70	—36—39°
Langstein	52·23	6·96	15·98	1·75	

2. Ovolglobulin. 1. Darstellung nach *Langstein.* [1])

Eine filtrierte Eierklarlösung, die vorher durch Schlagen von Membranen befreit ist, wird mit dem gleichen Volumen gesättigter, neutraler Ammonsulfatlösung versetzt. Nach kurzer Zeit filtriert man den entstehenden Niederschlag ab, löst ihn in einer verdünnten Salzlösung und reinigt ihn durch mehrfach wiederholtes Ausfällen mit dem gleichen Volumen gesättigter Am_2SO_4-Lösung aus solcher Lösung. Diese Umfällungen führen zu großen Verlusten, da ein Teil des Globulins sehr bald in verdünnten Salzlösungen unlöslich wird und dann beim Filtrieren sehr hindernd wirkt. Man behilft sich daher mit Zentrifugieren.

Der unlösliche Globulinanteil ist bis jetzt nicht genauer untersucht. Er stellt möglicherweise kein besonderes Globulin, sondern nur ein verändertes Globulin dar (vgl. hierzu bei Serumglobuline).

Der lösliche, mehrfach umgefällte und so gereinigte Anteil des Gesamtglobulins wird mit Alkohol aus seiner Lösung auskoaguliert, bis zum Verschwinden einer Schwefelsäurereaktion gewaschen und bei 110° getrocknet. Will man keine Fraktionierung vornehmen, so reinigt man das Gesamtglobulin der erstmaligen Ammonsulfatfällung derart, daß man den Niederschlag auf dem Filter mit einer Ammonsulfatlösung von 40°/₀ Sättigung wäscht. Nach 3—4 Tagen sind die ablaufenden Filtrate biuretfrei. Man nimmt das Globulin vom Filter, verreibt es von neuem in einer Reibschale mit einer Ammonsulfatlösung von der genannten Konzentration, filtriert und wiederholt die Prozedur 3—4mal, um alles Ovalbumin und Ovomukoid zu entfernen.

2. Darstellungsmethode eines Globulins nach *Osborne* und *Campbell.* [2]) Man fällt, wie sub 1 beschrieben, durch Halbsättigen mit Ammonsulfat, wäscht den Niederschlag gut mit 50°/₀iger gesättiger Am_2SO_4-Lösung

[1]) *L. Langstein,* Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **1.** S. 82 (1902).

[2]) *Th. B. Osborne* und *G. F. Campbell*, Die Proteinbestandteile des Eiereiweißes. Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. **22.** p. 422 (1900). — Rep. Connecticut Agricult. exp. Station. Vol. **23.** p. 348 (1900).

aus, löst ihn in wenig verdünnter Salzlösung und unterwirft die Lösung der Dialyse. Es fällt alsbald ein gummiartiger Niederschlag aus, der abfiltriert und mit Wasser und Alkohol gewaschen wird (Globulin I = Ovomucin im Sinne von *Eichholz*[1]).

Im Filtrat dieses Niederschlags findet sich ein zweites, wasserlösliches Globulin, das mit Ammonsulfat durch Sättigung gefällt und ganz wie das „Gesamtglobulin" nach *Langstein* gereinigt wird.

Beurteilung: Die Elementaranalysen und physikalischen und chemischen Eigenschaften der dargestellten Präparate reichen nicht aus, um die Globuline beider Darstellungsverfahren zu identifizieren. Die angewandte Methodik führt nur zu einem Protein von Globulineigenschaften, nicht zu einheitlichen Körpern.

Zusammensetzung nach	C	H	N	S	Asche	P
Langstein. Gesamtglobulin	51·93	7·04	15·17	1·99	0·24	—
„ lösliches Globulin . . .	51·46	6·98-7·03	15·12	1·64	0·21	—
Osborne und *Campbell.* Gesamtglobulin	51·91	7·07	15·13	2·0	—	—
„ „ „ löslich. Globulin	50·67	7·04	15·16	1·66	—	—
„ „ „ unlösliches Globulin-Ovomucin	50·69	6·71	14·49	2·28	0·53	+

Ein neuerer Versuch, die Eierglobuline zu fraktionieren, stammt von *Panormoff.* Die Resultate seiner Untersuchung zwingen nicht zu einer Wiedergabe seiner Methodik.

Qualitativer Nachweis eines Globulins in Eiereiweißlösungen geschieht durch die Globulinreaktion: Niederschlag bei Halbsättigung mit Ammonsulfatlösung oder Ganzsättigung mit Magnesiumsulfat, Niederschlag bei Verdünnung, Bestimmung des Koagulationspunktes für das zuerst gereinigte fragliche Globulin und seiner Sättigungsgrenzen für Salzsättigungen.

3. Ovomukoid ist ein Eiweißkörper mit den Eigenschaften der Muzine und wird in der älteren Systematik zu den sogenannten Glukoproteiden gezählt, das heißt zu jenen schleimartigen Eiweißkörpern, an deren molekularem Aufbau eine Kohlehydratgruppe (das Glukosamin) beteiligt ist (vgl. Mukoide).

Das Ovomuzin von *Eichholz*, das durch Verdünnen von 1 Volum Eiereiweiß mit 3 Volumen Wasser gefällt wird, zählt trotz seines Gehaltes einer mit Säuren abspaltbaren Kohlehydratgruppe (vermutlich die Folge von echter Mukoidbeimischung) nicht zu den Muzinen, sondern zu den Ovoglobulinen (siehe oben). Das natürliche Hühnereiweiß enthält 1·45—1·53% Ovomukoid.

Darstellung des Ovomukoids.

1. Nach *Mörner.*[2]) Eine frische Lösung von Eierweiß wird in der Hitze unter passendem Zusatz von Essigsäure auskoaguliert. Das klare Filtrat,

[1]) *A. Eichholz,* Die Hydrolyse der Albuminstoffe. Journ. f. Physiol. Bd. 23. S. 163 (1898).

[2]) *C. Th. Mörner,* Über eine im Hühnereiweiß in reichlicher Menge vorkommende Muzinsubstanz. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 18. S. 525 (1894).

das keine *Heller*sche Reaktion mehr zeigt, wird mäßig konzentriert und mit Alkohol niedergeschlagen: den Niederschlag preßt man ab, löst ihn erneut in Wasser und fällt in analoger Weise noch zweimal mit Alkohol um. (Die auch von *Mörner* angegebene Fällung durch Aussalzen mit Na_2SO_4 erübrigt sich heute.)

2. Nach *Willanen.*[1]) Man verdünnt Hühnereiweiß mit dem vierfachen Volumen Wasser, schüttelt gut durch, koliert ab und gießt die klare Lösung unter Zusatz von Essigsäure bis zu eben saurer Reaktion in das $1^1/_2$fache Volumen kochenden Wassers. Unter gutem Umrühren erhitzt man zuletzt zum starken Sieden und filtriert dann ab. Das Filtrat, das mit Quecksilberchlorid und Salpetersäure keinen Niederschlag gibt, wird auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingedampft, filtriert und in die fünffache Menge absoluten Alkohols gegossen.

Durch mehrfaches Lösen des abfiltrierten Niederschlags in Wasser und erneutes Fällen mit Alkohol, zuletzt durch Nachwaschen mit absolutem Alkohol und Äther entsteht ein trockenes Ovomukoidpulver.

3. Darstellung aus bereits koaguliertem Gesamteierweiß *(Willanen).* Man zerschneidet Hühnereiweiß fein, zerreibt es in einer Reibschale unter Zusatz von einer kleinen Menge Essigsäure mit einem großen Volumen Wasser und kocht dann auf. Ohne Essigsäurezusatz resultiert kein klares Filtrat. Sonst geschieht die Behandlung des Filtrates wie sub 2. beschrieben.

4. Nach *Milesi.*[2]) Man koaguliert das Gesamteiweiß des Eierweißes durch Zusatz eines großen Überschusses von 99%igem Alkohol, filtriert die Fällung ab und trocknet sie im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur. Das gewonnene Pulver wird dann mit wenig kaltem Wasser extrahiert. Die Extraktionsflüssigkeit wird mit Alkohol nach 2. weiterbehandelt.

Beurteilung: Alle genannten Methoden führen zu Präparaten, die im wesentlichen einheitlich sind:

	C	H	N	S	P %	
Elementarzusammensetzung:	48·79	6·96	12·51	2·23	+	*Langstein*
			12·68	2·2		*Mörner.*

Das Mukoid enthält eine Kohlehydratgruppe, u. zw. Chitosamin, in einer Menge von 34·9% auf Traubenzucker berechnet, das durch Säurespaltung, Pepsinverdauung und Fäulnis abgespalten werden kann. Dieses Chitosamin ist das einzige in dem Mukoid enthaltene Kohlehydrat *(Neuberg* und *Wolff).* Das Mukoid enthält keine Chondroitinschwefelsäure. Von den 2·22% Schwefel sind 1·39—1·43% leicht abspaltbar.

Von Eiweißreaktionen fallen positiv aus: die Xanthoprotein- und *Millon*sche Reaktion, die *Liebermann*sche Reaktion, die Reaktion nach *Adamkiewicz,* letztere nur bei Verwendung von Glyoxylsäure enthaltenden Eisessig.

[1]) *K. Willanen,* Über das Verhalten des Ovomukoids im Organismus. Biochem. Zeitschr. Bd. 1. S. 109 (1906).

[2]) *C. Milesi,* Di un corpo phosphorato isolato dall'Albume d'uovo presentante i caratteri chim. di un mucoide. Bollet. della soc. med. Chirurg. Pavia 1898.

Qualitativer Nachweis. Man beseitigt in der fraglichen Lösung die Proteine durch Auskoagulieren. Im Filtrat, das selbst nicht reduzieren soll, fällt man mit Alkohol und prüft den entstandenen Niederschlag auf den Gehalt einer Kohlehydratgruppe, indem man ihn mit 3%iger Salzsäure 3 Stunden lang kocht und die neutralisierte Lösung mit *Fehling*scher Lösung auf Reduktionsfähigkeit prüft.

II. Proteine des Eidotters. Man bezeichnet die Dotterproteine als Vitelline. Es sind dies Eiweißkörper mit Globulineigenschaften. Im Gegensatz zu diesen aber sind sie durch Kochsalz nicht fällbar. Da die Vitelline in der Form und Reinheit, die wir nach den gebräuchlichen Methoden zu erreichen vermögen, Phosphor enthalten, glaubte man, die Vitelline in die Gruppe der Nukleoalbumine einreihen zu müssen. Da sie ferner, wie die Nukleoalbumine, bei der Spaltung durch Pepsinsalzsäure oder gelinde hydrolytische Agentien Paranukleine bzw. Paranukleinsäuren liefern, schien diese Gruppierung zu den Nukleoalbuminen um so mehr berechtigt. Es mag wohl sein, daß einige der Eiervitelline, vielleicht jene der Fischeier, den Nukleoalbuminen nahestehen; trotzdem ist der Hinweis nötig, daß die Beteiligung des Phosphors am organischen Aufbau dieser Proteine noch keineswegs sichergestellt ist. Es fehlt bis heute an der Methode, diese Frage im positiven oder negativen Sinn zu entscheiden, und die Möglichkeit, daß der Phosphor einer Lezithin- oder Nukleoproteidverunreinigung entstammt, muß stets in Betracht gezogen werden.

1. Darstellung von Vitellin aus Vogeleidotter (*Weyl*).[1]) Man erschöpft den Dotter vom Hühnerei lange Zeit mit Äther. Die zurückbleibende weiße Masse wird in möglichst wenig 10%iger Kochsalzlösung gelöst und aus der filtrierten Lösung mit Wasser gefällt. Man erhält dabei einen Niederschlag, den man möglichst bald (noch vor dem Absitzen) abfiltriert, da er wie die Globuline sehr schnell seine Löslichkeit in Salzlösungen verliert. Das Lösen in NaCl-Lösung und Fällen mit viel Wasser wird ein zweites Mal wiederholt. Zur Lösung braucht man meist nur wenige Tropfen der Kochsalzlösung. Die zuletzt gefällte Masse wird mit Alkohol extrahiert (zur Befreiung von Lezithin!) und mit Äther getrocknet. Der Körper stellt ein durch die Alkoholbehandlung sicher verändertes Rohvitellin dar.

Darstellung nach *Levene* und *Alsberg*.[2])

Der Eidotter wird mechanisch vom Eiweiß getrennt, mit dem gleichen Volumen 10%iger NaCl-Lösung gemischt, mit Äther kräftig geschüttelt und 24 Stunden stehen gelassen. Der abgeschiedene Äther wird beseitigt, die Lösung erneut mit Äther geschüttelt und wieder 24 Stunden sich selbst

---

[1]) *Th. Weyl*, Beitrag zur Kenntnis tierischer und pflanzlicher Eiweißkörper. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 1. S. 74 (1878).

[2]) *P. L. Levene* und *C. Alsberg*, Zur Chemie der Paranukleinsäure. Zeitsch. f. phys. Chem. Bd. 31. S. 543 (1901).

überlassen. Nach 3maliger Wiederholung dieser Ätherextraktion entsteht eine durchsichtige, leicht filtrierende Lösung, aus der Farbstoffreste durch erneute Ätherextraktion entzogen werden.

Zu der NaCl-Lösung setzt man das 20fache Volumen Wasser. Nachdem sich der entstehende Niederschlag etwas gesenkt hat, hebert man das überstehende Wasser ab, ersetzt es durch frisches Wasser, rührt auf, läßt wieder absitzen und filtriert nach mehrmaligem Waschen in dieser Art zuletzt ab. Der Filterrückstand wird wieder in 10%iger NaCl-Lösung gelöst und im Scheidetrichter nochmals mit Äther, wie oben beschrieben, durchgeschüttelt. Dann filtriert man die vom Äther getrennte Lösung und fällt mit einem großen Überschuß Wasser. Der Niederschlag wird dann mit kaltem oder heißem Alkohol extrahiert, mit Äther nachbehandelt und diese Extraktion so lange fortgesetzt, bis eine Äther- bzw. Alkoholprobe keinen Rückstand hinterläßt.

Beurteilung: Man gelangt zu einem Präparat, das 0·84—1·21% Phosphor enthält.

Elementarzusammensetzung (*Osborne* und *Campbell*[1])

C 51·24, H. 7·16, N 16·38, S 1·04, P 0·94, Fe + %.

Über die Paranukleinsäure des Vogelvitellins siehe bei Nukleoalbuminen.

2. Vitelline aus Dotter von Fischeiern.

Die sogenannten Dotterplättchen des Fischrogens stellen kristallisiertes „Vitellin" dar. Dieselben lassen sich in kristallisierter Form präparativ und zu Demonstrationszwecken darstellen.

Isolierung der Dotterplättchen: Man zerdrückt die Eier der Knorpelfische oder des Karpfens mit Wasser. Dabei scheiden sich reichlich Eiweißkörper ab. Diese werden mit Wasser geschlemmt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Es werden so „regelmäßige tafelförmige Körnchen" bzw. rektanguläre oder nahezu quadratische, platte Täfelchen gewonnen (*Valenciennes* und *Frémy*[2]), *Radlkofer*[3]). Die Körper sind identisch mit dem folgenden, als Ichthulin bezeichneten Dottereiweißkörper.

3. Ichthulin.

Darstellung aus Karpfeneiern (*Walter*[4]).

Die Eierstöcke der Karpfen werden aus der sie umgebenden Haut heraus präpariert und mit Wasser abgespült. Alsdann wird der Rogen gut mit ausgewaschenem Sand zerdrückt und mit Wasser zu einem dünnen

---

[1]) *Th. Osborne* und *G. F. Campbell*, Die Proteide des Eidotters. Rep. of Connecticut Agricultur. exp. Station. Vol. 23 (1900). — Journ. of Americ. Chem. Soc. Vol. **22**. p. 413 (1900).

[2]) *A. Valenciennes* und *Frémy*, Recherches sur la composition des oeufs dans la série des animaux. C. r. T. **38**. p. 471 (1854).

[3]) *L. Radlkofer*, Über Kristalle proteinartiger Körper pflanzlichen und tierischen Ursprungs. Leipzig 1859.

[4]) *G. Walter*, Zur Kenntnis des Ichthulins und seiner Spaltprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **15**. S. 477 (1891).

Brei angerührt. Nach einer Stunde wird koliert und filtriert. Die Filtrate sind gelbbraun, opalisierend, trübe. Sie werden unter Umrühren in große Mengen Wasser eingegossen; die massige Trübung setzt sich nach Einleiten von Kohlensäure als flockiger Niederschlag ab. Das Rohichthulin ballt sich dann zu einer rötlichweißen, klebrigen Masse zusammen. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen. der Rest wird filtriert. Den Filterrückstand löst man in der ausreichenden Menge einer sehr verdünnten Magnesiumsulfatlösung und filtriert aufs neue. Das Filtrieren der klebrigen Lösung geht langsam vonstatten. (Da sich mit längerer Dauer der Salz- und Wasserwirkung ein beträchtlicher Anteil von Ichthulin als nunmehr unlöslicher Körper abscheidet, so gehen erhebliche Mengen bei dieser Filtration verloren.)

Das Filtrat wird erneut mit viel Wasser gefällt und zentrifugiert. Der Niederschlag wird dann mit Alkohol und Äther auf dem Filter ausgewaschen.

Das Ichthulin stellt dann ein weißes, hygroskopisches Pulver dar. das sich beim Trocknen (110°) etwas gelblich färbt.

Elementarzusammensetzung: C 53·52, H 7·70, N 15·64, S 0·41, P 0·43, Fe 0·10% im Mittel.

In den Säurezersetzungsflüssigkeiten findet sich eine die *Fehling*sche Lösung reduzierende Substanz. Über das Paranuklein siehe die Nukleoalbumine.

Darstellung aus Kabeljaueiern (*Levene*[1]).

Der Fischrogen wird gut mit Sand zu einem Brei verrieben und in einer Handpresse ausgepreßt. Eier- und Sandgemisch werden in größeren Flaschen mit 5%iger Chlorammoniumlösung übergossen und erst allein, dann nach Zusatz großer, mehrfach gewechselter Äthermengen geschüttelt. Über Nacht hat sich der Äther abgetrennt. Die wässerige Schicht wird filtriert und mit dem 20fachen Volumen Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag wird auf einem Filter mit Wasser gewaschen und in gleicher Weise behandelt (Lösen in $MgCl_2$-Lösung, Schütteln mit Äther, Filtrieren, Fällen mit Wasser). Nun wird die Fällung bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gewaschen. Es folgt eine Extraktion mit heißem und kaltem Alkohol, wodurch der vorher weiße Niederschlag orangegelb wird (!). Danach wird nochmals mit absolutem Alkohol und mit Äther getrocknet.

Das Ichthulin des Kabeljaueis enthält im Gegensatz zu jenem aus Karpfeneiern keine Kohlehydratgruppe.

Über die in ihm enthaltene Paranukleinsäure vgl. die Nukleoalbumine.

Die Elementaranalyse ergibt die Zusammensetzung:

C 52·44, H 7·45, N 15·96, S 0·92, P 0·65%.

III. Die Eiweißkörper der Milch.

In der Milch sind die folgenden Eiweißkörper genauer bekannt: Kasein, Laktalbumin, Laktoglobulin und Opalisin. Es liegt kein

[1]) *P. A. Levene*, Über das Ichthulin des Kabeljaus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **32**. S. 281 (1901).

Grund vor, in der Milch außer den genannten Körpern noch andere, bisher nicht isolierte Milchproteine anzunehmen.

1. Kasein ist ein Protein, das in der üblichen Systematik der Eiweißkörper zur Gruppe der Nukleoalbumine zählt. d. h. zu Proteinsubstanzen. die im wesentlichen Ähnlichkeit mit Globulinen aufweisen und durch den Gehalt an Phosphor ausgezeichnet sind. Das Kasein verschiedener Tiergattungen scheint verschieden zu sein.

Darstellung aus Kuh- oder Ziegenmilch nach *Hammarsten.*[1]) Man verdünnt die nach Möglichkeit schon etwas abgerahmte Milch mit dem 4fachen Volumen Wasser. Zu diesem Gemenge setzt man so viel Essigsäure. daß die verdünnte Lösung einen Gesamtsäuregehalt von 0·75 bis 1‰ Essigsäure gewinnt. Das sich alsbald abscheidende Kasein wird zugleich mit dem niedergerissenen Milchfett über Leinwand abfiltriert. danach in einer Reibschale unter Wasser möglichst fein zerrieben. und unter Dekantieren der jeweils überstehenden Wassermenge möglichst zuckerfrei gewaschen. Nun wird mit Hilfe von möglichst wenig verdünntem Alkali (NH_3 oder $^1/_{10}$ n-NaOH) gelöst. Die Kaseinlösungen werden filtriert. Ein Teil des Milchfettes wird bei dieser Filtration von den Filterporen zurückgehalten. Der größere Teil wird bereits vor dieser Filtration durch Abschöpfen beseitigt. In dem klaren oder nur leicht opalisierenden Filtrat wird die Kaseinfällung durch Zusatz von sehr wenig verdünnter Essigsäure wiederholt. Das Lösen des wieder abfiltrierten Kaseins und Fällen wird ein drittes Mal wiederholt. Die zuletzt entstehende Kaseinfällung wird auf dem Filter mit reichlichen Mengen destillierten Wassers gründlich von den letzten Spuren Essigsäure befreit. Der Filterrückstand wird hierauf mit 97%igem Alkohol in kleinen Portionen zu einer Emulsion verrieben. Den sich bald absetzenden Kaseinanteil trennt man möglichst schnell von dem darüber stehenden Alkohol. Dieses Waschen mit Alkohol wird möglichst lange fortgesetzt. Zuletzt werden die Kaseinmengen auf dem Filter durch Waschen mit Äther von Alkohol befreit und hierauf in offenen Schalen innig mit Äther zerrieben. Dann wird das fein zerriebene Kasein im Soxhletapparat einer energischen Ätherextraktion unterworfen. Dieselbe muß so lange fortgesetzt werden. bis eine Probe der Extraktionsflüssigkeit keinen Rückstand hinterläßt. Das nunmehr fettfreie Kasein wird im Vakuum oder bei einer Temperatur von 60—70° getrocknet.

Eine Modifikation dieser Methode, welche die Entfettung erleichtert, haben *Danilewski* und *Radenhausen*[2]) angegeben.

2 *l* Milch werden mit 8 *l* Wasser verdünnt und mit 10 *cm* Eisessig versetzt. Das Kasein wird sofort gefällt. Nach Senkung desselben wird

[1]) *O. Hammarsten,* Zur Kenntnis des Kaseins und der Wirkung des Labfermentes. Nov. Act. Reg. Soc. Sc. Upsala. Jg. **1877**. Autoreferat. *Malys* Jahresbercht. Jg. **1877**. S. 158. — Ferner vgl. daselbst: *Malys* Jahresbericht. Jg. **1872**. S. 118 undi Jg. **1874**. S. 135.

[2]) *A. Danilewski* und *P. Radenhausen,* Untersuchungen über die Eiweißstoffe der Milch. *Malys* Jahresbericht. Jg. **10**. S. 186 (1880). — Forschungen aus dem Gebiete der Viehhaltung. Bremen. Jg. **1880**. S. 9.

die saure Molke abgehebert. Das Kasein wird sofort mit 2—4 *l* destilliertem, schwach angesäuertem Wasser gewaschen und über einem Leinwandtuch gut abgepreßt. Der Rückstand wird in einer Reibschale mit einer geringen Menge einer 1—2%igen Ammoniaklösung gut verrieben. Der dicke Brei wird alsdann mit derselben Ammoniaklösung auf 1000 bis 1500 cm^3 aufgefüllt, wobei er allmählich in Lösung geht. Hierbei scheidet sich das Milchfett sehr vollständig an der Flüssigkeitsoberfläche ab und wird leicht nach 24 Stunden abgerahmt. Durch Zusatz von 10—12 cm^3 Eisessig zur abgerahmten Lösung entsteht abermals eine Kaseinfällung, die noch 2mal in der beschriebenen Weise in 1—2%igem NH_3 gelöst und mit Essigsäure wieder gefällt wird. Schließlich wird die letzte Säurefällung mit destilliertem Wasser auf Leinwand bis zur Neutralität der ablaufenden Flüssigkeit gewaschen, im Soxhletapparat gut mit Alkohol und Äther erschöpft und an der Luft getrocknet.

Die mehrfache Umfällung aus schwach ammoniakalischer Lösung erhöht ohne Zweifel die Kaseinreinheit und erleichtert auch das Entfernen des Fettes, das sich in der ammoniakalischen Lösung leicht absetzt.

Großes Gewicht ist auf eine ergiebige Ätherextraktion zur Entfernung der letzten Fettspuren zu legen. Eine Kontrolle am Abdampfrückstand von Proben der Extraktionslösung ist immer geboten. Es sei ferner betont, daß selbst die als Caseinum purissimum nach *Hammarsten (Merck)* im Handel befindlichen Präparate keineswegs absolut fettfrei sind! Es muß daher eine solche Ätherextraktion oft tagelang fortgesetzt werden.

Darstellung von Kasein aus Frauenmilch nach *Kobrak.*[1])

Man versetzt die zentrifugierte Milch mit $^1/_5$ ihres Volums $^1/_{10}$ n-Essigsäure und unterwirft diese Lösung 5 Tage lang im Pergamentschlauch der Dialyse gegen täglich erneuertes Chloroformwasser. Nach dieser Zeit erst hat sich das Kasein abgeschieden. Man zentrifugiert die Fällung aus, wäscht sie auf einem Papierfilter gut mit schwach angesäuertem (Essigsäure) Wasser, behandelt dann mit Alkohol und mit Äther und läßt eine energische Ätherextraktion im Soxhletapparat nachfolgen. Schließlich trocknet man im Vakuum.

Die Elementaranalysen maximal gereinigter Kaseine ergaben folgende Werte:

	C	H	N	S	P %	
Aus Kuhmilch:	52·96	7·05	15·65	0·758	0·847	*Hammarsten.*
			15·45	0·75	0·77	*Laqueur* u. *Sackur*
	53·3	7·07	15·91	0·82	0·84-0·89	*Chittenden* u. *Painter.*
Aus Frauenmilch:	52·24	7·32	14·97	1·12	0·68	Asche 1%.

Für Kuhmilch beträgt $(\alpha)_D = -80^0$ in neutraler, -76^0 in alkalischer, -91^0 in salzsaurer Lösung. *Long* fand $(\alpha)_D = -97·8 - 111·8^0$ in $^1/_{10}$ n-NaOH-Lösung.

[1]) *E. Kobrak,* Beiträge zur Kenntnis des Kaseins der Frauenmilch. *Pflügers* Arch. Bd. **80**. S. 69 (1900).

Reaktionen zur Feststellung eines Körpers als Kasein: Man löst den fraglichen Eiweißkörper in verdünnten Alkalien oder Alkalikarbonaten zu einer auf Lackmus neutral reagierenden Lösung und fällt ihn mit Essigsäure. Ist durch mehrfaches Wiederholen dieser Prozedur der Körper einigermaßen gereinigt, so überzeugt man sich, daß seine salzfreie Lösung bei Erhitzung nicht koaguliert. Eine Probe des Körpers wird auf den Gehalt an Phosphor geprüft. Fällt diese Probe positiv aus, so bestimmt man, um sich vor einer Verwechslung mit einem Nukleoproteid zu schützen, ob der betreffende Körper Nukleinbasen enthält. Ist diese Probe negativ ausgefallen, so ist das Vorhandensein des Nukleoalbumins sichergestellt. Der endgültige und eindeutige Nachweis des Kaseins geschieht durch den Nachweis der Gerinnbarkeit des gelösten Kaseins mit Labferment.

Darstellung von Kaseinlösungen, die mit Lab gerinnen, nach *Courant.*[1])

Man löst ein nach *Hammarsten* dargestelltes Kasein in Kalkwasser und neutralisiert mit Phosphorsäure oder Salzsäure: z. B. 0·3 *g* Kasein werden in 10 cm^3 gesättigtem Kalkwasser gelöst. Zu dieser Lösung fügt man 2·9 cm^3 $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure. Will man statt dessen zur Neutralisation Phosphorsäure verwenden, so ist soviel Säure zuzusetzen, als nötig ist, um das nicht an Kasein gebundene Calcium in Tricalciumphosphat umzuwandeln. Eine solche Lösung gerinnt aber mit Lab noch nicht. Erst das Hinzufügen von mehr H_3PO_4 führt zu diesem Ziel, dadurch, daß auch der an Kasein gebundene Kalk in das Triphosphat verwandelt wird.

Beispiel: 0·3 *g* Kasein in 10 cm^3 gesättigten Kalkwassers + 3·1 cm^3 $^1/_{10}$ n-Phosphorsäure.

Im allgemeinen erhält man gut gerinnende Lösungen, wenn man mit dem Säurezusatz bis zur Neutralisation gegen Lackmus als Indikator fortschreitet.

Statt Kalkwasser kann man auch Natriumkarbonat als Lösungsmittel verwenden: in dem Falle löst man das Kasein in soviel stark verdünnter Sodalösung, daß eben eine gegen Lackmus neutral oder amphoter reagierende Lösung entsteht. Solche Lösungen von Kasein gerinnen aber nach Behandeln mit wirksamem Lab erst dann, wenn ein lösliches Kalksalz, z. B. $CaCl_2$, zugefügt wird.

Umwandlungs- beziehungsweise Spaltprodukte des Kaseins.

1. Durch Erwärmen auf 94—100° und darüber hinaus erleidet das Kasein eine Spaltung. Es entsteht ein in verdünnten Laugen lösliches Isokasein (A) und ein in Laugen unlösliches, in ihnen nur gallertartig quellendes Albuminat, das Natriumkaseid (B). *Laqueur* und *Sackur.*[2])

[1]) *G. Courant,* Über die Reaktion der Kuh- und Frauenmilch und über ihre Beziehungen zur Reaktion des Kaseins und der Phosphate. *Pflügers* Archiv. Bd. **50**. S. 109 (1891).

[2]) *E. Laqueur* und *D. Sackur,* Über die Säureeigenschaften und das Molekulargewicht des Kaseins und seine Spaltung beim Trocknen. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **3**. S. 193 (1903).

Trennung beider Körper: Man erwärmt das trockene Kasein im Wärmeschrank während 12—18 Stunden auf 102—107°. Das so vorbehandelte Präparat wird in $^1/_{10}$ n-Natronlauge aufgeschwemmt. Es geht A in Lösung, B bleibt als ziemlich feste, nicht gallertartige Masse, am Boden des Gefäßes sich absetzend, zurück. Dieser Rückstand wird solange mit ganz verdünnten Laugen ($n/_{200}$) gewaschen und wieder dekantiert, bis sich ein mit Phenolphtalein versetztes Wasser beim Aufschwemmen mit einer Probe des Rückstandes B von selbst rot färbt. Hierauf filtriert man B auf der Nutsche ab, wäscht mit großen Mengen Alkohols und Äthers und pulverisiert den Rückstand zu einem staubfreien gelblichen Pulver.

A kann in der für das Kasein beschriebenen Weise aus seiner Alkalilösung mit verdünnter Essigsäure gefällt werden. Die Reinigung erfolgt wie dort durch mehrfaches Umfällen.

2. Parakasein ist derjenige Eiweißkörper, der aus Kasein unter dem aller Wahrscheinlichkeit nach spaltenden Einfluß von Labferment entsteht, und der bei Labwirkung auf genuine Milch in Form des unlöslichen parakaseinsauren Kalkes (Käse) ausfällt.

Darstellung von Parakasein aus reinem Kasein.[1]) Man löst reines Kasein nach *Hammarsten* in der zur Lösung eben nötigen Menge verdünnter Natronlauge. Zu dieser Natriumkaseinlösung von nahezu neutraler Reaktion setzt man eine ausreichende Menge von wirksamem Labferment (Magensaft, Magenschleimhaut usw., am besten Labpulver) und hält die Lösung etwa 10 Minuten im Brutschrank bei 37°. Alsdann zerstört man das Lab durch Erhitzen auf 90° und verdünnt mit dem vierfachen Volumen Wasser. Nun versetzt man die Lösung vorsichtig mit sehr verdünnter Essigsäure bis zu beendeter Fällung, filtriert den flockigen Niederschlag ab und löst ihn wieder in ganz verdünnter Natronlauge. Die Umfällung mit verdünnter Essigsäure aus der alkalischen Lösung wird zweimal wiederholt. Der zuletzt entstehende Niederschlag wird auf dem Filter gut mit Wasser gewaschen und rasch mit Alkohol und Äther nachbehandelt.

Wenn es sich nicht um die Reindarstellung des Parakaseins handelt, so kann man den Körper aus seiner Lösung durch Neutralsalze (Halbsättigung mit Ammonsulfat, Ganzsättigung mit rohem, d. h. kalkhaltigem Kochsalz) aussalzen. Die Salzfällung wird der Dialyse unterworfen, wobei Lösungen von reinem Parakasein entstehen.

Eine Darstellung des Parakaseins aus seinem Kalksalz, d. h. aus dem Kasein etwa durch Lösen mit Soda und Fällen desselben mit Säure führt nicht zu einem unveränderten Parakasein.

Elementarzusammensetzung: C 53·94, H 7·14, N 15·14, S 1·01, P 1·3%.

Qualitativer Nachweis des Parakaseins (zugleich als Kaseinnachweis verwertbar). Zu der bei 37° belassenen kalkfreien Lösung von

[1]) *H. Koester*, Einige Beiträge zur Kenntnis des Kaseins und seiner Gerinnung mit Labferment. Upsal. läkaref. Forh. S. 16; *Malys* Jahresbericht. Bd. **11**. S. 14 (1881).

Kasein mit Labferment setzt man eine Spur eines löslichen Kalksalzes, am besten Calciumchlorid. Bei einem Gehalt von 0·2% Chlorcalcium erfolgt sofort eine Abscheidung in Form des flockigen Käses.

Quantitative Bestimmung des Parakaseins. Man bestimmt in einer abgemessenen Probe der der Labwirkung unterworfenen Kaseinlösung den Gesamtstickstoffgehalt. Eine Multiplikation dieses Wertes mit 6·24 ergibt den Gehalt an Eiweiß (Kasein).

In einer gleichgroßen Probe fällt man das entstandene Parakasein mit Essigsäure. Die entstandene Fällung bringt man quantitativ auf ein Filter und wäscht den Filterrückstand solange mit Wasser aus, bis die Waschflüssigkeiten keine Biuretreaktion mehr geben. Den Niederschlag verascht man alsdann feucht und bestimmt den N-Gehalt nach *Kjeldahl*. Der gefundene Wert, mit 6·37 multipliziert, ergibt die Menge Parakasein.

Die Methode gestattet das Auffinden von Annäherungswerten über die Mengenverhältnisse, in denen sich das Kasein in Parakasein und andere Proteinbestandteile (s. u.) zerlegt.

Versuche der Zerlegung des Parakaseins in einzelne Fraktionen (nach *v. Herwerden* [1]) scheinen zu beweisen, daß auch das durch Essigsäure fällbare Parakasein aus 2 Körpern besteht.

Man läßt Lab auf eine ganz schwachsaure Natriumkaseinatlösung 3 Stunden einwirken. Hierauf unterbricht man die Fermentwirkung durch Erwärmen auf 90° und fällt das gebildete Parakasein mit Essigsäure. Nun löst man den von Essigsäure durch Waschen befreiten Niederschlag mit ganz verdünnter Natronlauge bis zu schwachsaurer Reaktion der Lösung und fällt nun mit einem Überschuß von $CaCl_2$. Dieser Niederschlag stellt die Kalkverbindung eines Parakaseins A dar.

Im Filtrat dieser Fällung läßt sich ein durch Ca-Salz nicht mehr fällbares Parakasein B mit verdünnter Essigsäure ausfällen. Diese Fällung hat vorsichtig zu erfolgen, in der Weise, daß soviel Essigsäure verwandt wird, um in dem Filtrat der Fällung die Reaktion mit Ferrocyanwasserstoff eben zum Verschwinden zu bringen. Im Filtrat des erstmalig durch Essigsäure gefällten Parakaseins A + B ist ein Parakasein C enthalten, das durch Sättigen der Lösung zu 60% gesättigter Ammonsulfatlösung oder durch Tannin ausgefällt wird.

Die 3 Körper sind bisher nur qualitativ bestimmt und differenziert.

3. Das Molkeneiweiß (Hemikaseinalbumose, Laktoserumproteose). Mit diesem Namen bezeichnet man die Gesamtheit der Eiweißkörper, die sich in dem Filtrat eines durch Labwirkung aus Kasein entstandenen Parakaseins finden und nach der Beseitigung des Parakaseins als Kalksalz oder durch Essigsäurefällung gelöst bleiben.

Aller Wahrscheinlichkeit handelt es sich um eine Mehrzahl von Proteinkörpern, deren Menge und Natur von der Dauer der Labwirkung, d. h. dem Grade der Kaseinzerlegung in Parakasein und Molkeneiweiße abhängt.

---

[1]) *M. v. Herwerden*, Beitrag zur Kenntnis der Labwirkung auf Kasein. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. 52. S. 184 (1907).

Qualitativer Nachweis und quantitative Bestimmung des Molkeneiweißes.[1,2]) Man stellt sich eine Lösung von reinem Kasein dar, indem man dasselbe in der eben ausreichenden Menge einer 1%igen Na_2CO_3-Lösung auflöst. Diese frisch bereitete Lösung wird durch Zentrifugieren geklärt. Abgemessene Proben werden mit einer frischen Lablösung (1 Teil käufliches Labpulver auf 10.000 Teile Wasser) versetzt und auf ein gleiches Volumen aufgefüllt. Nach beliebigen Verdauungszeiten (bei 37°) unterbricht man die Labwirkung durch Erhitzen auf 90—95° und fällt das gebildete Parakasein durch Zusatz des gleichen Volums einer gesättigten Ammonsulfatlösung zu der Labprobe aus. Das Filtrat dieses Niederschlags wird durch Zufügen von Am_2SO_4 auf Ganzsättigung gebracht. Hierdurch entsteht ein zweiter Niederschlag aus Molkeneiweiß (qualitativer Nachweis!). Will man relative Werte zur Bestimmung des gebildeten Molkeneiweißes erhalten, so bestimmt man in den unverdünnten Filtraten des Parakaseins die Stickstoffmenge. Sind 90 *cm*³ einer 2%igen Natriumkaseinatlösung der Labwirkung ursprünglich ausgesetzt, so fügt man dieser Lösung nach Zerstören des Labs 40 *g* festes Kochsalz (Rohsalz mit im Mittel 0·4% Ca und 0·05% Mg) zu, filtriert von dem sich abscheidenden Parakasein ab und bestimmt in 50 *cm*³ des nicht verdünnten Filtrates (= entsprechend 90 *cm*³ ursprünglicher Lösung) den Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl*. Man gewinnt so relative Zahlenwerte über die nach wechselnden Zeiten gebildeten Molkeneiweißmengen.

Bei allen diesen Versuchen ist die Wirksamkeit des Labs zu kontrollieren. Man verwendet am besten die 2—3fache Menge einer Lablösung, die zur Parakaseinbildung binnen 10 Minuten benötigt wird.

Der N-Gehalt der Lablösung (0·005%) darf vernachlässigt werden.

Molkenalbumose. Man versteht unter dieser Bezeichnung einen Eiweißkörper, der von *Fuld* aus den Molkeneiweißen isoliert worden ist. Bei ihrem Nachweis läßt *Fuld* die Parakaseinbildung unter besonderen Bedingungen vor sich gehen, die eine sekundäre Hydrolyse vollständig ausschließen.

Darstellung und Nachweis einer Molkenalbumose nach *Fuld*.[3])

Man geht von einer nach *Courant* (vgl. S. 386) dargestellten Kaseinlösung aus. Auch Kaseinpräparate der Firma Rhenania in Aachen sind verwertbar. Kasein, meist 10 *g*, wird mit einer geringen Menge Kalkwasser angerührt und unter Umrühren und Erwärmen auf dem Wasserbade fast vollständig in Lösung gebracht.

Dann neutralisiert man die Lösung mit einer stark verdünnten Phosphorsäure unter Kontrolle des Neutralisationspunktes durch Tüpfeln auf Lackmuspapier. Die bleibende milchweiße Lösung wird mit reinen Eis-

[1]) *E. Petry*, Über die Einwirkung von Labferment auf Kasein. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 8. S. 339 (1906).

[2]) *S. Schmidt-Nielsen*, Die Beziehung des Molkeneiweißes zur Labgerinnung (Parakaseinbildung). *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 9. S. 322 (1907).

[3]) *E. Fuld*, Über die Molkenalbumose. Biochem. Zeitschr. Bd. 4. S. 488 (1907).

stückchen rasch unter 10° abgekühlt und mit einer ausreichenden Menge trockenen Labpulvers versetzt. Nun wird die Lösung im Eisschrank bei einer unter 10° liegenden Temperatur belassen. Diese künstliche Milchlösung gerinnt in der Kälte. Das voluminöse Gerinnsel wird auf ein schnell filtrierendes Filter gebracht und aus der klar abfließenden Molke das noch gelöste Kasein und das schon gebildete, aber noch nicht ausgefallene Parakasein mit Essigsäure gefällt. Der Zusatz der Essigsäure hat vorsichtig zu geschehen, um jeden Überschuß zu vermeiden. Es genügen zur Fällung ganz geringe Mengen verdünnter Säure, deren Wirkung noch durch das Freiwerden der in Freiheit gesetzten zweiten Phosphorsäurevalenz erhöht wird.

Nun wird das Filtrat dieser Säurefällung zur quantitativen Beseitigung der Kasein- bzw. Parakaseinreste auf dem Wasserbade auf 70° erhitzt, eventuell, wenn nötig, mit weiteren geringen Mengen Essigsäure versetzt.

Das nunmehr gewonnene Filtrat enthält die Molkenalbumose, die entweder indirekt durch N-Bestimmungen oder direkt durch qualitative Reaktionen nachweisbar ist.

Eine Reindarstellung der Molkenalbumose aus dieser Lösung, etwa durch Aussalzen, ist wegen des gleichzeitigen Gehalts an Calcium oder Phosphorsäure nicht möglich.

Der qualitative Nachweis einer Molkenalbumose wird durch die folgenden Reaktionen erbracht. Mit Essigsäure tritt weder in der Wärme noch in der Kälte eine Fällung auf. Mit Salpetersäure entsteht eine Trübung, die sich beim Erwärmen klar löst und beim Abkühlen wiederkehrt. Die Reaktion ist auch in verdünnten Lösungen positiv. In gleicher Weise wirkt die Salzsäure. Für diesen durch Mineralsäuren fällbaren Anteil des Gesamtmolkeneiweißes wählt *Fuld* den Namen der Molkenalbumose. Aus dem Gehalt an Stickstoff im Gesamtmolkeneiweiß des letzten Filtrates und dem der Mineralsäurefällung ergibt sich, daß die fällbare Molkenalbumose nur etwa die Hälfte des Molkeneiweißes darstellt.

2. Laktalbumin. Die Isolierung erfolgt analog den Seite 335 ff. beschriebenen Albuminen.

3. Laktoglobulin. Darstellung nach *Sebelien*.[1])

Man befreit zunächst die Milch von Kasein. Man sättigt zu diesem Zweck die Milch, die man vorher zu amphoterer Reaktion neutralisiert hat, mit pulverisiertem Kochsalz in Substanz unter gutem Umrühren. Von der Fällung, die ganz aus Kasein, zum geringsten Teil aus Spuren von Globulin besteht, filtriert man ab. Das klare Filtrat sättigt man mit pulverisiertem Magnesiumsulfat, wobei eine flockige Fällung entsteht. Der Körper wird auf dem Filter gesammelt, zwischen Filtrierpapier abgepreßt, in wenig Wasser gelöst (die noch anhaftenden Salzmengen genügen zur Lösung des Globulins) und aus dieser Lösung erneut mit $MgSO_4$ bei Ganzsättigung gefällt. Den 2mal umgefällten Körper löst man in Wasser und unterwirft ihn der Dialyse.

[1]) *J. Sebelien*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper der Kuhmilch. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 9. S. 453 (1885).

Aus der Lösung scheidet sich das Globulin beim Dialysieren meist nicht aus, höchstens entsteht eine Trübung, die durch eine Spur Kochsalz wieder in Lösung geht. Die Lösung fällt man mit Alkohol und trocknet das gefällte Globulin in der üblichen Weise mit Alkohol und Äther.

Die Darstellung eines reinen Globulins aus Molke, d. h. aus dem Filtrat einer Käsefällung, ist nicht ratsam, da auch Anteile des Molkeneiweißes oder nicht gefällte Parakaseinanteile bei einer $MgSO_4$-Sättigung mit ausfallen können.

Der Körper scheint mit dem Serumglobulin identisch zu sein. Koagulationstemperatur 72° in 5—10%iger NaCl-Lösung.

4. Opalisin ist ein nicht globulin- oder albuminartiger Körper, der sich in den Mutterlaugen des durch Essigsäure gefällten Kaseins von Frauen-, Stuten- und Kuhmilch findet. Am reichsten ist seine Ausbeute aus Frauenmilch, am geringsten aus Kuhmilch.

Die Mengen und Eigenschaften dieses Körpers, ebenso wie die von *Wroblewski*[1]) angewandte Darstellungsmethode sind so wenig präzisiert, daß die Besprechung dieses atypischen Proteins hier übergangen werden darf.

Die Eiweißkörper des Kolostrums sind nach den für die Milch gültigen, oben beschriebenen Methoden darstellbar: *Tiemann*[2]), *Sebelien* (l. c. S. 390, Note 1). Das Kolostrumkasein ist in Spuren vorhanden und mit dem der Milch identisch.

Das Kolostrumglobulin, nach der Methode von *Sebelien* dargestellt, scheint, nach der Elementarzusammensetzung zu schließen (C 49·83, H 7·77, N 15·28, S 1·24, C 25·88%), von dem der Milch verschieden. Indeß ist zu bedenken, daß das von *Sebelien* analysierte Präparat keinen Anspruch auf absolute Reinheit machen kann, oder daß in dem von *Tiemann* analysierten Kolostrumglobulin nur ein Globulinanteil, etwa der wasserlösliche Anteil, vorgelegen hat. (Vgl. hierzu den Absatz über die Mehrzahl der Serumglobuline.)

Methoden zur quantitativen Bestimmung der Proteine in der Milch.

1. Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes der Milch. Fällung mit Gerbsäure: *Sebelien.*[3]) Man verdünnt 5 oder 10 *cm*³ Milch mit dem 9fachen Volumen Wasser, fügt etwas physiologische Kochsalzlösung hinzu und setzt nun einen Überschuß, etwa das 1½fache Volumen der angewandten unverdünnten Mischung an Almenscher Gerbsäurelösung hinzu. Diese Lösung bereitet man sich, indem man 4 *g* Gerbsäure in 8 *cm*³ 25%iger

[1]) *A. Wroblewski,* Ein neuer eiweißartiger Bestandteil der Milch. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 26. S. 308 (1893).

[2]) *H. Tiemann*, Untersuchungen über die Zusammensetzung des Kolostrums mit besonderer Berücksichtigung der Eiweißkörper desselben. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 25. S. 363 (1898).

[3]) *J. Sebelien*, Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweißkörper mit besonderer Berücksichtigung der Milch. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 13. S. 157 (1889).

Essigsäure löst und hierzu 190 cm^3 von 40—50%igem Alkohol zusetzt. Die durch die Gerbsäure entstehende Fällung läßt man absitzen; dann trennt man die überstehende Flüssigkeit ab, schickt diese durch ein gewogenes, trockenes Filter, filtriert und spült dann den Niederschlag quantitativ nach. Der Filterrückstand wird mit kaltem Wasser nachgewaschen. In ihm wird nach *Kjeldahl* der Stickstoff bestimmt. Der gefundene N-Wert, mit 6·37 multipliziert, ergibt den Gehalt an Gesamteiweiß.

2. Fällung mit Alaun und Kupferoxydhydrat *Ritthausen-Munk*.[1]) Man verdünnt 10 cm^3 Milch in einem 250 cm^3 fassenden Becherglas auf 100 cm^3 mit Wasser, neutralisiert die möglicherweise alkalisch reagierende Lösung und erhitzt. Vor dem beginnenden Sieden fügt man 1—2 cm^3 Alaunlösung zu, bei eben beginnendem Sieden 2—5 cm^3 von aufgeschwemmtem, alkalifreiem Kupferoxydhydratbrei. Dann kocht man einige Minuten lang. Der feinflockige Niederschlag der Fällung setzt sich schnell nach Entfernen der Flammen ab. Man filtriert noch warm, wäscht den Filterrückstand mit heißem Wasser aus, verascht den Niederschlag mitsamt dem Filter feucht und bestimmt den Stickstoff nach *Kjeldahl*. Der gefundene N-Wert ergibt, mit 6·37 multipliziert, den gesuchten Proteingehalt.

3. Bestimmung von Kasein und Albumin + Globulin in Tiermilch (mit Ausnahme der Eselinnenmilch). Man mischt 20 cm^3 Milch mit 380 cm^3 Wasser und fällt unter Umrühren solange mit verdünnter Essigsäure, bis sich ein flockiger Niederschlag bildet. Man beendet hierauf die Kaseinfällung durch Einleiten von Kohlensäure während $^1/_2$ Stunde. Hierauf läßt man bis zum anderen Tag stehen. Da die Kaseinfällung nicht unter allen Umständen so gelingt, daß sich der Niederschlag gut zu Boden absetzt, so macht man diese Säurefällung gleichzeitig an 3 verschiedenen Milchproben und wählt dann die bestgelungene zur weiteren Verarbeitung. Man filtriert zunächst die klare Flüssigkeit, dann den Niederschlag quantitativ durch ein N-freies Filter und wäscht den Filterrückstand gut mit Wasser aus.

Dieser Filterrückstand wird mit starkem Alkohol übergossen. Die erst trübe durchlaufenden Filtrate werden wieder aufgegossen, bis ein klar ablaufendes Filtrat entsteht. Ist der Filterrückstand gut mit Alkohol durchgefeuchtet, so läßt man diesen erst bei 40° verdunsten und wäscht dann mit Äther nach. Nun bringt man das gesamte Filter mit dem Rückstand in die Hülse eines Soxhletapparates und extrahiert lange Zeit mit Äther.

Das nun entfettete Kasein wird mitsamt dem Filter verascht und auf seinen N-Gehalt nach *Kjeldahl* untersucht. Der N-Wert × 6·37 = Kaseinwert. Das Filtrat der ersten Kaseinfällung wird auf Albumin und Globulin verarbeitet, indem man beide Eiweißkörper durch Erhitzen der Lösung auskoaguliert, auf einem Filter quantitativ sammelt, auswäscht und dann nach *Kjeldahl* auf ihren N-Gehalt bestimmt. Dieser Wert × 6·37 = Albumin + Globulinwert.

[1]) *I. Munk*, Die quantitative Bestimmung der Eiweiß- und Extraktivstoffe in der Kuh- und Frauenmilch. Arch. f. path. Anat. Bd. **134**. S. 501 (1893).

Bei Verarbeitung von Frauenmilch nach dieser Methode muß die Essigsäure- und Kohlensäurefällung des Kaseins in der auf 40° erwärmten Milchwasserlösung ausgeführt werden, um eine Abscheidung des Kaseins zu erzielen.

4. Bestimmung von Kasein und Globulin + Albumin nach *Schlossmann.*[1]) 10 *cm*³ Milch werden mit 30—50 *cm*³ Wasser verdünnt, auf dem Wasserbad auf 40° erwärmt und mit 1 *cm*³ einer konzentrierten Lösung von Kalialaun versetzt. Erfolgt nicht alsbald unter Umrühren eine mittelflockige Abscheidung, so fügt man in Abständen von je $^1/_2$ Minute noch $^1/_2$ *cm*³ Alaunlösung hinzu, bis das gewünschte Ziel erreicht ist. (Ein Alaunüberschuß von mehr als 1 *cm*³ ist zu vermeiden.) Während der Fällung soll die Temperatur dauernd 40° betragen. Nun filtriert man quantitativ durch ein stickstofffreies Filter, bis man ein klar abfließendes Filtrat gewinnt, und wäscht den Filterrückstand gut mit Wasser aus.

Eine N-Bestimmung nach *Kjeldahl* im Filterrückstand ergibt den Kaseingehalt (siehe sub 3).

Das klare Filtrat der Alaunlösung wird mit 10 *cm*³ *Almen*scher Gerbsäurelösung versetzt und nach der sub 1. beschriebenen Methode weiter verarbeitet.

5. Bestimmung von Albumin und Kasein + Globulin. 10 *cm*³ Milch werden mit 30—40 *cm*³ einer gesättigten $MgSO_4$-Lösung versetzt. Hierauf trägt man bei einer Temperatur von 40° portionenweise fein pulverisiertes Magnesiumsulfat bis zur Sättigung ein. Von dem Globulin- und Kaseinniederschlag filtriert man nach einigen Stunden durch ein N-freies Filter ab und wäscht mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung nach. (Die Filtration geht sehr langsam vonstatten!)

Aus dem Filtrat, das man mit Wasser verdünnt, fällt man das Albumin durch Hitzekoagulation unter Essigsäurezusatz. Der sich abscheidende Niederschlag wird auf einem N-freien Filter quantitativ gesammelt, gut ausgewaschen und auf seinen N-Gehalt nach *Kjeldahl* verarbeitet. Der N-Wert × 6·37 ergibt den Albumingehalt.

Die $MgSO_4$-Fällung wird nach einer der vorbeschriebenen Methoden entfettet und nach *Kjeldahl* auf den N-Gehalt untersucht. Dieser Wert, mit 6·37 multipliziert, ergibt den Wert für Globulin + Kasein.

IV. Proteine des quergestreiften Muskels.

Als Muskelproteine sind bekannt das Myosin (Myosinfibrin), Myogen (lösliches Myogenfibrin, unlösliches Myogenfibrin) und Myoproteid (Nukleoproteid). Die Körper in Klammern sind Umwandlungsprodukte der vorangestellten Proteine.

Als Ausgangsmaterial der Darstellung dieser Proteine dient ein Muskelplasma, das aus vollkommen blutfreien Muskeln gewonnen wird.[2])

[1]) *A. Schlossmann*, Über Eiweißstoffe der Milch und die methodische Trennung derselben. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **22**. S. 221 (1897).

[2]) *O. v. Fürth*, Über die Eiweißkörper des Muskelplasmas. Arch. f. exp. Pharm. u. Path. Bd **36**. S. 231 (1895).

Entblutung. In die Jugularvene eines Tieres läßt man 250—400 *cm*³ einer auf 35—40° erwärmten physiologischen Kochsalzlösung einfließen. Bei einem Verbrauch von 100—200 *cm*³ beginnt ein Zittern des Tieres, doch wird die Prozedur im ganzen gut ertragen. Das Einfließen hat langsam zu erfolgen und muß bei Herzarhythmie oder verlangsamter Herzaktion für einige Minuten unterbrochen werden. Nach dem Verbrauch dieser Menge (400 *cm*³) und bei noch guter Herzaktion läßt man aus der Karotis verbluten, während gleichzeitig der Rest der Kochsalzlösung nunmehr schnell nachfließt. Zugleich macht man tüchtige Herzmassage. Vor dem Todeseintritt sollen zweckmäßig 300—600 *cm*³ Na Cl-Lösung bereits zugeflossen sein.

Sofort nach dem Tode eröffnet man das Abdomen, präpariert die Aorta frei, bindet unterhalb des Abgangs der Nierenarterie eine Kanüle ein und läßt unter erheblichem Druck solange Kochsalzlösung zufließen, bis die aus der Hohlvene ablaufende Flüssigkeit farblos bleibt. Unter Beuge- und Streckbewegung der Extremitäten beschleunigt man diesen Prozeß. Meist genügen im Maximum 1200 *cm*³ als Spülflüssigkeit.

Muskelplasma. Man präpariert die Muskeln der Extremitäten ab, zerkleinert sie mit dem Wiegemesser (keine Fleischhackmaschine verwenden!), zerhackt sie mit dem Wiegemesser fein und zerreibt den Gewebebrei mit Bimsstein und einer 0·6%igen Kochsalzlösung zu einem Brei. Dieser wird sofort oder nach Aufheben im Eisschrank in ein Koliertuch eingeschlagen und in der Tinkturenpresse ausgepreßt. Die ablaufende Flüssigkeit wird durch Faltenfilter filtriert. Bei einiger Geschicklichkeit läßt sich die ganze Prozedur vom Beginn der ersten Durchspülung in 25 bis 30 Minuten ausführen.

Die Flüssigkeit stellt das Muskelplasma dar, das frei von Albumin sein soll. Man überzeugt sich von diesem Freisein.

Das Plasma reagiert frisch meist schwach alkalisch oder neutral, wird aber beim Stehen in Zimmertemperatur meist sauer.

Handelt es sich nicht um die Darstellung der von *v. Fürth* näher präzisierten Proteinkörper, so läßt sich ein Muskelplasma auch durch Extrahieren mit anderen Neutralsalzlösungen gewinnen. Man verwendet alsdann 12—15%ige Ammoniumchloridlösung oder 5%ige Lösungen von Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat. Die Methodik bleibt in der Ausführung die oben beschriebene.

I. Darstellung und Trennung des Myosins und Myogens durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat (siehe S. 393, Note 2).

1. Myosin (= Paramyosinogen von *Halliburton.*[1]) Man versetzt das albuminfreie Muskelplasma mit einer gesättigten Ammonsulfatlösung, und zwar so, daß auf 2 Teile Plasma 1·5 Teile Salzlösung kommen. Der entstehende Niederschlag setzt sich flockig ab. Die Flüssigkeit darüber wird abgegossen. Den Niederschlag löst man in einer verdünnten Kochsalzlösung, in der meist

[1]) *W. D. Halliburton,* On muscle proteids . . . Journ. of phys. Vol. 8. p. 331 (1887).

ein Teil ungelöst bleibt, und filtriert die Lösung ab. Das opaleszente Filtrat wird mit $^3/_4$ seines Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, wodurch das Myosin erneut gefällt wird. Nach dem Abtrennen von der überstehenden Flüssigkeit löst man den Niederschlag wieder in Wasser und fällt, falls eine Isolierung beabsichtigt wird, unter Denaturieren mit Alkohol. Das ausgefällte Myosin wird gut mit Wasser salzfrei gewaschen. Die genannten Manipulationen sind alle möglichst schnell durchzuführen, da sich das Myosin durch Spontangerinnung — sichtbar an der Trübung seiner Lösungen — in unlösliches Myosinfibrin verwandelt.

2. Myogen (= Myosinogen von *Halliburton*). Das ammonsulfathaltige Filtrat der eben genannten Myosinfällung wird auf eine Sättigung von 50% Ammonsulfat gebracht. Verzichtet man auf die Darstellung des Myosins, so setzt man zum vornherein dem Muskelplasma das $1^1/_4$fache seines Volums an gesättigter Ammonsulfatlösung zu und filtriert von dem entstehenden Niederschlag ab. Wenn das Filtrat dieses Niederschlags wirklich myosinfrei ist, so darf eine kleine Probe desselben, auf 50° erhitzt, keine Abscheidung mehr ergeben. Nunmehr sättigt man die Lösung durch Eintragen von feingepulvertem Ammonsulfat in Substanz, filtriert von dem gebildeten Niederschlag ab, wäscht diesen mit gesättigter Am_2SO_4-Lösung aus, preßt ihn ab und löst ihn in Wasser. Die klar filtrierte Lösung erhitzt man auf 40°, um dadurch lösliches Myogenfibrin zu beseitigen (siehe unten). Eventuell kann dann eine Umfällung mit Ammonsulfat vorgenommen werden. Aus der Lösung läßt sich das Myogen zuletzt mit Alkohol fällen, salzfrei waschen und unter Denaturierung mit Alkohol und Äther trocknen.

Lösliches Myogenfibrin findet sich nicht im frischen Muskelplasma der Warmblüter, wohl aber in älteren, 1—2tägigen Plasmen, da es sich beim Stehen des Plasmas allmählich aus Myogen bildet. Im Muskelplasma der Kaltblüter (Fische und Amphibien) ist das lösliche Myogenfibrin ein präformierter Bestandteil.

Man fällt aus diesem Plasma das Myosin durch Halbsättigung mit Ammonsulfat. Die von dem Niederschlag abfiltrierte Lösung wird auf 40° erwärmt. Das Auftreten einer Trübung oder Flockung zeigt die Anwesenheit des Myosinfibrins an.

II. Trennung des Myosins vom Myogen: *a)* Durch Dialyse; *b)* durch fraktionierte Wärmekoagulation.

Ad *a)* Dialyse: Man füllt das albuminfreie Muskelplasma in Dialysenschläuche aus Pergament und dialysiert 12—24 Stunden gegen laufendes, dann ebenso lange gegen destilliertes Wasser. Der entstehende Niederschlag, das Myosin, wird abfiltriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und eventuell nach Wunsch durch Erhitzen auf 45—50° in Myosinfibrin verwandelt. Das Filtrat, welches Myogen (und lösliches Myogenfibrin) enthält, wird, wie oben beschrieben, weiter behandelt, eventuell sofort mit Alkohol gefällt.

Ad *b)* Fraktioniertes Auskoagulieren. Die genannten Eiweißkörper haben sehr verschiedene, miteinander nicht zusammenfallende Koa-

gulationstemperaturen. Im Plasma gerinnt Myosin bei 47—50°. Myogen gerinnt bei 55—65° und lösliches Myogenfibrin bei 40°.

Es ist daher die Möglichkeit vorhanden, die verschiedenen Proteine durch Koagulieren in einem Muskelplasma nebeneinander präparativ, qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

Wir beschreiben sofort die quantitative Bestimmung, aus der die Bedingungen für die Methodik der Darstellung oder Trennung sowie für den qualitativen Nachweis klar hervorgehen:

Quantitative Bestimmung der Muskelproteine.[1])

Man erhitzt eine Probe von 10 cm^3 frischen Muskelplasmas einige Zeit auf 100°. Die Menge des ausfallenden Koagulates stellt das Gesamteiweiß dar.

Eine zweite Probe von 10 cm^3 wird während 5 Minuten auf 40° erhitzt. Es koaguliert das präformierte, lösliche Myogenfibrin.

10 cm^3 werden während 5 Minuten auf 50° erhitzt. Es fällt das Myosin + lösliches Myogenfibrin aus.

Eine vierte Probe, auf 70° erhitzt, enthält Myosin und das Myogen als unlösliches Myosin- bzw. Myogenfibrin.

Zum Zweck gleichmäßiger Gerinnungsbedingungen bringt man die einzelnen 5 Proben in gleich große Zentrifugengläschen von gleicher Wandstärke und taucht sie in ein auf die gewünschte Temperatur gebrachtes Wasserbad ein. Die Temperatur kontrolliert man mit einem Thermometer, das nicht in eine der Proben selbst, sondern in ein sechstes, mit Wasser gefülltes Röhrchen eintaucht. Natürlich muß auch die Badetemperatur direkt am Thermometer gemessen werden. Die Temperaturschwankungen dürfen bei gutem Umrühren im Wasserbad 1° nicht übersteigen.

Die Niederschläge werden dann in der Zentrifuge dekantiert, mit destilliertem Wasser unter Aufschwemmen und durch erneutes Zentrifugieren chlorfrei gewaschen. Die Waschwasser schickt man zur Sicherung vor Verlusten durch vorher gewogene Filter und spült schließlich die Niederschläge quantitativ auf die Filter; dann wäscht man mit Alkohol und Äther nach, trocknet bei 110° und wägt nach dem Erkalten.

Die Tabelle gibt die Resultate für ein normales Kaninchenmuskelplasma wieder *(Steyrer)*.

In 10 cm^3 Plasma		Niederschlag in Gramm	Niederschlag in $^0/_0$ des Ges.-Eiweiß	Myosin : Myogen
Gesamteiweiß . .	100°	0·3623	100	—
Myosin + Myogen .	70°	0·3490	96·33	—
Myosin	50°	0·0637	18·25	18:78
löslich. Myogenfibrin	40°	0·0061	1·68	—
Albumin	—	—	3·67	—

Die absoluten Mengen der Muskelproteine lassen sich durch Subtraktion einer Fraktion der Tabelle von der nächst höheren der Tabelle bestimmen.

[1]) *H. Steyrer,* Ein Beitrag zur Chemie des entarteten Muskels. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 4. S. 234 (1904).

das eventuell vorhandene Albumin resultiert aus der Differenz der letzten Koagulationsfraktion (70°) vom Gesamteiweiß (100°). Für die qualitative oder präparative Bestimmung verfährt man so, daß man hintereinander auf 40°, 50° und 70° erhitzt und vor jeder Koagulation bei der nächsthöheren Temperatur von dem abgeschiedenen Koagulat abfiltriert.

3. Myoproteid ist ein Körper, der im Muskelplasma der Warmblüter nicht vorkommt. Er findet sich mit Sicherheit nur im Fischmuskel (siehe S. 398, Note 1).

Darstellung: Aus blutfreien Muskeln des Karpfens oder aus käuflichem Fleisch von Seefischen, aus denen genau wie aus Warmblütermuskeln ein Plasma hergestellt wird.

Man versetzt das Plasma vorsichtig mit verdünnter Essigsäure bis zu eben saurer Reaktion und kocht dann 10 Minuten lang. Nach dem Abfiltrieren von dem entstandenen Koagulum bleibt ein klares, goldgelbes Filtrat, das nach dem Abkühlen mit Essigsäure zu stark saurer Reaktion versetzt wird. Das weiße, flockig ausfallende Proteid läßt man absetzen und dekantiert es wiederholt mit Wasser. Dann löst man in verdünnter Ammoniaklösung, fällt wieder mit Essigsäure, filtriert und löst nach gutem Abpressen mit verdünnter NH_3-Lösung. Hierauf neutralisiert man die Lösung mit Essigsäure, fällt mit Alkohol und behandelt den abfiltrierten Niederschlag mit heißem Wasser, Alkohol und Äther.

4. Das Nukleoproteid der quergestreiften Muskeln (*Pekelharing*[1]).

Man tötet das Tier (Hund, Kaninchen) durch Verbluten und durchspült von der Aorta abdominalis mit physiologischer Kochsalzlösung. Läuft die Spülflüssigkeit klar und farblos aus der Vene ab, so präpariert man die Muskeln der unteren Extremitäten frei von Fett und Bindegewebe und zerhackt sie fein. Darauf extrahiert man mit 0·15%iger Na_2CO_3-Lösung. Die Extrakte, die nach einigen Stunden aus den Muskeln durch geringen Druck ausgepreßt werden (etwa 1 *l* auf 500 *g* Fleisch), werden durch Filter gesaugt und bis zu ziemlich stark saurer Reaktion mit Essigsäure versetzt. Es bildet sich ein Niederschlag, der in der Zentrifuge von der Flüssigkeit getrennt und aus sehr verdünnter NH_3-Lösung mit Essigsäure umgefällt wird. Der Körper wird wiederum in der Zentrifuge ausgeschleudert, abfiltriert und erst mit 85%igem, dann mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen.

Ausbeute aus 543 *g* Fleisch: 2 *g* lufttrockenes Proteid.

Der Gehalt an Phosphor beträgt 0·7%, Asche 0·46%.

Der Körper, der, wie die Nukleoproteide mit Pepsinsalzsäure behandelt, ein säureunlösliches Nuklein abspaltet, enthält Alloxurbasen. Identifiziert ist nur das Guanin. Das Nuklein enthält 3·5% Phosphor.

Die Beziehung dieses Proteids zu dem Myoproteid *v. Fürths* ist nicht festgestellt. Vielleicht sind beide Körper identisch.

---

[1]) *C. A. Pekelharing*, Über das Vorhandensein eines Nukleoproteids in den Muskeln. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 22. S. 245 (1897).

V. Proteine der glatten Muskelzellen.

Es liegen Untersuchungen von *Velichi, Capelli, Swale, Vincent, Lewis* und *v. Fürth* vor. Methodisch bieten die Untersuchungen nichts Neues im Vergleich zu den bereits genannten Darstellungsmethoden.

Die Prinzipien sind die einer Extraktion des Muskelmagens vom Schwein, von der Gans oder vom Schaf, von Uterusmyomen, von Stichopusarten (Seewalze) und von Cephalopoden[1]) mit physiologischer NaCl-Lösung und Trennung durch Dialyse in ein fällbares Globulin und ein gelöstes Albumin (?), oder fraktioniertes Koagulieren oder Fällen mit Am_2SO_4 nach *v. Fürth*. Die technischen Details solcher Untersuchungen sind die sub II *a, b* beschriebenen (S. 395).

Die isolierten Fraktionen stimmen nicht mit den durch *v. Fürth* so gut definierten Proteinen der quergestreiften Muskeln überein.

VI. Sonstige Albumine und Globuline.

Wir sind bisher in der Besprechung der nicht kristallisierenden tierischen Proteine so vorgegangen, daß wir nicht die Reihenfolge der üblichen Proteinsystematik eingehalten haben. Wir haben es vorgezogen, die Besprechung an der Hand von einigen Körperflüssigkeiten durchzuführen. Die Berechtigung hierzu glauben wir darin zu finden, daß diese Gewebssäfte hinsichtlich der in ihnen vorkommenden Proteine wohl am besten erforscht sind, und daß wir auch annehmen dürfen, daß die in ihnen enthaltenen Proteine endgültig qualitativ und quantitativ bestimmt sind. Es fällt dabei auf, daß wir es hier mit Flüssigkeiten oder mit Organen zu tun haben, die in ihrem Proteingehalt sehr konstant zusammengesetzt sind (Serum, Eier, Milch).

Bei weitem geringere Erfolge weist die Forschung im Studium der Organ- und Zelleiweiße auf. Wir müssen gestehen, daß wir heute noch nicht imstande sind, etwa chemisch von einem Organeiweiß, d. h. etwa von einem speziellen Lebereiweiß oder Niereneiweiß zu sprechen. Wir wissen nur, daß in den Organen und in einigen Sekretprodukten drüsiger Organe oder in unseren Stützgeweben noch eine Reihe von Eiweißkörpern vorkommen. In der Besprechung dieser Proteinsubstanzen müssen wir uns aber an die alte, klassische Systematik der Proteine halten. Denn wir können von diesen Proteinen nur sagen, daß sie auf Grund dieser oder jener Eigenschaften in diese oder jene Proteingruppe einzuordnen sind, nicht aber, daß sie etwa die speziellen Eigenschaften einer Organzellart aufweisen.

Der Besprechung dieser Körper schließen wir in einem Anhang die Abhandlung jener Proteinsubstanzen an, die durch sekundäre Veränderung genuiner Proteine, einerlei welcher Klasse und Herkunft, entstehen, d. h. die eiweißartigen, künstlichen Umwandlungsprodukte der Proteine.

---

[1]) *O. v. Fürth*, Über die Eiweißkörper der Kaltblütermuskeln und ihre Beziehungen zur Wärmestarre. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 31. S. 238 (1900).

Albumine. Außer den bereits genannten Albuminen in Serum, Chylus, Milch und Ei sind keine weiteren albuminartigen Proteine bekannt.

Gruppe der Globuline. Außer den genannten Globulinen im Blut, Ei, Milch, Kolostrum und Muskel sind eine ganze Reihe von Zellglobulinen isoliert. Wir erwähnen die Darstellungsmethode solcher Globuline, fügen aber hinzu, daß ihre Präexistenz im Gewebe nicht garantiert ist, und daß die Spezifität und Einheitlichkeit solcher Körper bis jetzt ganz unbewiesen geblieben ist.

Generelle Darstellungsmethode der **Zellglobuline.**

Darstellung nach *Halliburton* [1]): Die Niere oder Leber wird in situ post mortem von der Aorta abdominalis aus mit 0·6%iger Kochsalzlösung blutfrei gespült. Die Organe werden hierauf fein zerkleinert und mit 5%iger Magnesiumsulfatlösung kalt extrahiert. In den kalten Extraktlösungen kann man sich durch fraktionierte Bestimmung von Koagulationstemperaturen über die Zahl und vielleicht auch über die Natur der in ihnen gelösten Proteine orientieren, auch durch Versuche der Salzfällung die Fällungsgrenzen dieser Körper genauer festlegen.

Nach *Pohl* [2]): Man befreit das zu verarbeitende Organ nach Möglichkeit von Blut, indem man es in situ von den zuführenden Arterien aus so lange mit 0·8%iger Kochsalzlösung durchspült, bis die Spülflüssigkeit aus den abführenden oder entfernteren Venen farblos abläuft.

Bei der Leber z. B. schickt man die Lösung rückläufig durch die Vena cava ascendens und läßt durch die abdominellen Gefäße ablaufen, indem man temporär die Gefäße am Leberhilus, die Venae gastroduodenales und die Cava ascendens mit Klammern verschließt, um die Flüssigkeit vorübergehend zu stauen. Das ganz entblutete Organ zerkleinert man zu einem feinen Brei und schüttelt diesen nach Toluolzusatz tüchtig mit 0·8%iger NaCl-Lösung durch. Nach 24stündigem Stehen in der Kälte wird durch Filtration ein Plasma gewonnen, das nach wiederholtem Zurückgießen der ersten Filtratportionen klar und durchscheinend ist, neutral reagiert und die Farbe von Blutserum hat.

Das Verhalten dieser Eiweißlösung gegen Neutralsalze spricht für einen Gehalt an Globulinen, ohne daß es bisher möglich wäre, verschiedene Organglobuline zu unterscheiden.

Zu ihrer Darstellung säuert man mit 0·1—0·2%iger Essigsäure schwach an. Es entsteht sofort ein (im Säureüberschuß unlöslicher!) Niederschlag. Dieser Niederschlag kann zur Reinigung in verdünnten Alkalien gelöst werden. (Im Gegensatz zur Globulinnatur ist der Körper in Neutralsalzlösungen unlöslich!) Durch erneuten Säurezusatz wird das Organeiweiß wieder gefällt. Da Spontangerinnungen der Lösungen leicht eintreten, so ist schnelles Arbeiten angezeigt.

[1]) *W. D. Halliburton,* The proteids of kidney and liver cells. Journ. of physiol. Vol. **13**. p. 808 (1880).

[2]) *J. Pohl,* Über Organeiweiß. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 7. S. 381 (1906).

Eine Fraktionierung dieser Globuline, etwa durch Dialyse, gelingt nicht Die Lösungen trüben sich bei wochenlangem Dialysieren, verlieren die Fähigkeit, bei 40° zu koagulieren und werden unfällbar durch Salzsäure (Gegensätze zu echten Globulinen).

Elementarzusammensetzung eines Leberglobulins der Pferdeleber:

C 47·21—48·43, N 16·35, H 6·79, S 0·99, P 1·3, Fe + %

Der Phosphorgehalt schwankt zwischen 0·28—1·3%.

Globuline der Kristallinse: α- und β-Kristallin.

Darstellung eines Plasmas durch Wasserextraktion der Linse nach *Mörner*.[1]) Die Linsen (ca. 30 *g*) werden mit destilliertem Wasser oder $^1/_4$-gesättigter Kochsalzlösung (10 cm^3 auf 1 *g* Linsensubstanz) in einer Flasche geschüttelt. Nach $1^1/_2$tägigem Schütteln haben sich alle Linsenfasern in Wasser aufgeschwemmt. Die nicht zerstörten Linsenkerne werden in einer Reibschale zerdrückt. Dann wird das Schütteln fortgesetzt, bis die ganze Linsenmasse gleichmäßig im Wasser verteilt ist. Nach Verlauf eines Tages hat sich die Hauptmasse der Fasern zu Boden gesenkt. Die überstehende Flüssigkeit wird abfiltriert. Der Bodensatz wird dann wiederholt noch so oft in der beschriebenen Weise mit der Salzlösung zur Extraktion geschüttelt, bis die Filtrate keine *Heller*sche Eiweißprobe mehr geben.

Das Ungelöste wird zur Isolierung von Albumoiden verwandt.

Das Linsenplasma, das auf Globuline verarbeitet werden soll, wird zweckmäßig mit Wasser, nicht mit Kochsalzlösung hergestellt.

1. α-Kristallin: Man stellt das Extrakt in der beschriebenen Art aus der ganzen Linse, oder nur aus ihrer äußeren Hälfte dar.

Das klar filtrierte Extrakt wird mit Essigsäure gefällt, so daß die Mischung 0·02—0·04% an Essigsäure enthält. Der feinflockige Niederschlag wird abfiltriert, was leicht geschieht. Dann läßt man eine 2—3malige Umfällung durch Lösen in 0·01%igem Ammoniak und Fällen mit äußerst verdünnter Essigsäure folgen.

Die letzte Fällung wird auf dem Filter mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet. Zur Ausführung von Reaktionen wird der Körper vor der Alkoholbehandlung zu neutraler Lösung in äußerst verdünntem Ammoniak gelöst.

2. β-Kristallin wird aus den Wasserextrakten der inneren Linsenteile dargestellt. Durch Schütteln in der oben beschriebenen Weise wird $^3/_4$ bis $^4/_5$ der Linsenmasse erst entfernt: die Linsenkerne werden dann abfiltriert und genau in der beschriebenen Weise getrennt weiter verarbeitet. Die Reinigung des mit Essigsäure gefällten Körpers geschieht durch Umfällen oder Alkoholzusatz.

Eigenschaften. Die Kristalline verhalten sich gegen Am_2SO_4 oder $MgSO_4$ wie echte Globuline. Abweichend von Globulineigenschaften ist die

[1]) *C. Th. Mörner*, Untersuchungen über die Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18. S. 61 (1894).

Erscheinung, daß sie aus ihrer Lösung weder durch Verdünnung noch durch Ganzsättigung mit Kochsalz fällbar sind.

α-Kristallin: C 52·83, H 6·94, N 16·68, S 0·56%.
$(\alpha)_D = -46·9°$ (in 3·29%iger Lösung).
Koagulationstemperatur: 73° in 1·35%iger Lösung.

β-Kristallin: N 17·4, S 1·27. Koagulationstemperatur 63°.
$(\alpha)_D = -43·1—43·3$ (in 1·80—3·12%iger Lösung).

Das Totaleiweiß der Linse besteht aus 32% β- und 19·5% α-Kristallin neben 0·5% Albumin und 48% Albumoid.

Globulin der Thyreoidea. Thyreoglobulin ist ein natürliches Halogeneiweiß mit typischen Globulineigenschaften. Durch Säurehydrolyse läßt sich aus ihm das Jodothyrin gewinnen.

Darstellung nach *Oswald*[1]): Als Ausgangsmaterial wählt man am besten Schilddrüsen vom Schwein (da die Thyreoglobuline verschiedener Tiere nicht den gleichen Gehalt an Jod aufweisen, so muß man, wenn man etwa später die Darstellung einer größeren Menge Jodothyrins erstrebt, eine möglichst jodreiche Drüse verarbeiten. Am reichsten jodhaltig ist das Globulin des Ochsen, 0·86%, am ärmsten das des Hammels, 0·39%. Innerhalb derselben Tierart schwankt der Jodgehalt mit der geographischen Verbreitung des Tieres und mit dem physiologischen Zustand der Drüse).

Die frische, fettfrei präparierte Schilddrüsenmasse wird fein zerhackt, im Mörser mit Quarzsand zerstoßen und hierauf mit physiologischer Kochsalzlösung angerührt. Den dünnen Brei läßt man nach Zusatz von etwas Thymol in Substanz oder in alkoholischer Lösung 24 Stunden im Eisschrank stehen. Alsdann koliert man durch ein Tuch und versetzt das rötliche, trübe Extrakt mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammonsulfatlösung. Der entstehende Niederschlag setzt sich nach einiger Zeit zu Boden, wird auf einem Filter gesammelt, mit halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung gewaschen, bis seine rötliche Farbe in eine graue Farbe umgeschlagen ist. Dann löst man in Wasser und filtriert die trübe Lösung durch zahlreiche Faltenfilter. Jedem Trichterinhalt setzt man etwas Thymol zu. Die ersten trüben Filtratanteile werden wieder auf den Trichter gebracht. Da die Filterporen meist verstopfen, kürzt man das langwierige Filtrieren, indem man die Filter täglich erneuert. Es dürfen zur weiteren Verarbeitung nur unbedingt klare, zellfreie Filtrate verwandt werden.

Zu den vereinigten Filtraten setzt man das gleiche Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung. Der jetzt schneeweiße, sich bald zusammenballende Niederschlag dieser Fällung wird auf einem Seidenfilter gesammelt, als-

[1]) *A. Oswald*, Die Eiweißkörper der Schilddrüse. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **27**. S. 64 (1899). — Zur Kenntnis des Thyreoglobulins. Ibid. Bd. **32**. S. 121 (1901).

dann in Wasser gelöst, bis zur Schwefelsäurefreiheit der Lösung dialysiert, hierauf mit 96%igem Alkohol aus seiner Lösung gefällt. Der Körper wird dann auf Seidenfilter gesammelt und mit Alkohol und Äther nachbehandelt.

Anstatt der Ammonsulfatlösung läßt sich das Thyreoglobulin aus den klaren Drüsenextrakten auch mit Essigsäure fällen. Man setzt solange verdünnte Essigsäure zu, bis der entstehende Niederschlag flockig wird. (Ein Säureüberschuß ist zu vermeiden!) Der auf einem Seidenfilter gesammelte Niederschlag wird aus seiner Lösung in sehr verdünntem Alkali (1 Teil Na OH auf 1000 Teile Wasser) abermals mit Essigsäure gefällt, mit angesäuertem Wasser dekantiert, auf dem Filter gesammelt und getrocknet.

Das Filtrat der erstmaligen Fällung dieses Globulins wird zur Verarbeitung auf das Nukleoproteid der Thyreoidea verwendet.

Eigenschaften. Der Körper hat in seinem Verhalten gegen Salzlösungen Globulineigenschaften, verhält sich aber nur insofern abweichend, als er aus seinen mäßig salzhaltigen Lösungen durch Zusatz verdünnter Säuren ausfällt.

Koagulationstemperatur 65° in einer 10%igen $MgSO_4$-Lösung, in salzfreier Lösung tritt keine Hitzekoagulation ein. Der Körper enthält eine Kohlehydratgruppe, die keine Pentose ist.

Elementarzusammensetzung im Mittel: C 52·01, H 6·93, N 16·61, J 1·57, S 1·95, (O 20·85), Asche 0·42 bzw. C 51·96, H 6·68, N 16·54, J 1·75, S 1·77, Asche 0·47%.

Darstellung von Jodothyrin (Thyreojodin) direkt aus der Schilddrüse *(Baumann)*.[1] Man kocht am besten Hammelschilddrüsen oder stark jodhaltige Strumen während 15 Stunden mit 10%iger Schwefelsäure, 4 Gewichtsteile Säure auf 1 Teil Drüsengewebe. Aus der abgekühlten Lösung wird das Fett mechanisch oder durch Kolieren entfernt. Der in der Lösung befindliche flockige Jodothyrinniederschlag wird auf dem Filter gesammelt. Ausbeute $^3/_4$—$1^1/_2$% des Drüsengewichts. Durch Einengen des in seiner sauren Reaktion abgestumpften Filtrates, noch besser nach Entfernen der Schwefelsäure mit Baryumkarbonat werden noch geringe Mengen Jodothyrin ausgefällt. Die vereinigten feinsten Niederschläge werden wiederholt mit 90%igem Alkohol ausgekocht. Die alkoholischen Extrakte werden eingedunstet. Der Rückstand wird mit der 10fachen Menge Milchzucker zerrieben und mit Petroläther, dann mit einem Gemenge von wasserfreiem Äther mit Petroläther ausgezogen. Nach Entfernung des Milchzuckers mit der 7fachen Menge heißen Wassers wird in NaOH gelöst (5%ig) und mit Essigsäure gefällt. Lösung und Fällung werden wiederholt.

---

[1]) *E. Baumann*, Über das normale Vorkommen von Jod im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **21**. S. 319 (1895). — *E. Baumann* und *E. Roos*, ibidem. Bd. 21. S. 481 (1896); ferner Bd. **22**. S. 1 (1896). — *E. Roos*, Über die Wirkung des Thyreojodins. Ibidem. Bd. **22**. S. 16 (1896).

Elementarzusammensetzung: C 58·2, H 7·4, N 8·9, S 1·4, J 14·3. Asche 0·4%.

Ein dem Thyreojodin *Baumanns* ähnlicher, vielleicht mit ihm identischer Körper läßt sich durch Hydrolyse von Thyreoglobulin nach *Oswald*[1]) isolieren.

Die Einheitlichkeit und Reinheit beider Körper ist nicht gesichert.

Gruppe der Nukleoalbumine.

Man bezeichnet mit diesem Namen globulinähnliche Proteine, die durch den Gehalt an Phosphor, einige wenige auch durch den Gehalt einer Kohlehydratgruppe ausgezeichnet sind. Der Begriff Nukleoalbumine ist scharf von dem der Nukleoproteide zu trennen, denn es fehlt den ersteren das Charakteristische der letzteren, die im Molekül enthaltenen Purinbasen.

Da man aus einer Anzahl von Nukleoalbuminen durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure oder durch andere gelinde hydrolytische Mittel einen in verdünnten Säuren und Wasser unlöslichen Körper gewinnen kann, der in seinen äußeren Eigenschaften an das aus den echten Nukleoproteiden unter gleichen Bedingungen entstehende Nuklein, bzw. die aus diesem hervorgehende Nukleinsäure, erinnert, so bezeichnete man die Nukleoalbumine auch als Paranukleoproteide, und jene abspaltbaren Körper als Para- oder Pseudonukleinsäure, bzw. Paranuklein. Auch glaubte man in dem Entstehen eines solchen Paranukleins eine für die Körperklasse der Nukleoalbumine charakteristische Eigentümlichkeit zu erkennen. Die Bezeichnung „Nukleoalbumin" ist eine unglückliche, und die angebliche Spezifität der Paranukleine ist nicht vorhanden.

Der Aufbau eines Nukleoalbumins aus einer Nukleinsäure bzw. einem Nuklein und einer Eiweißkomponente im Sinne einer proteidartigen Bindung ist ganz unbewiesen. Man täte gut, den Namen Nukleoalbumine, der durch das Wort „Nukleo" zu Verwechslungen führen könnte, ganz durch das Wort Phosphoglobulin zu ersetzen *(Cohnheim)*. Enthält ein solches Globulin auch ein Kohlehydrat, so spricht man von einem Glykophosphoglobulin.

Wie wir die durch Spaltung der „Nukleoalbumine" entstehenden „Paranukleine" auffassen sollen, ist noch unentschieden. Wir können in diesen Substanzen nur besonders geartete, komplizierte Bruchstücke des ursprünglichen Proteins sehen, deren Zusammensetzung offenbar von der Darstellungsmethode, d. h. dem angewandten hydrolytischen Agens und der Intensität seiner Wirkung mehr abhängig ist, als von der verarbeiteten Muttersubstanz selbst.

Die Feststellung eines Proteins als Nukleoalbumin geschieht durch den Nachweis des Phosphorgehalts bei gleichzeitigem Fehlen von

[1]) *A. Oswald*, Die Eiweißkörper der Schilddrüse. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 27. S. 14 (1899); Zur Kenntnis des Thyreoglobulins. Ibidem. Bd. 32. S. 121 (1901).

Purinbasen nach vorangegangener Hydrolyse. Wichtig ist ferner, daß Nukleoalbumine in neutraler Lösung, d. h. die Salze der Nukleoalbumine, in der Hitze nicht koagulieren.

Das Entstehen eines Paranukleins unter Pepsinsalzsäurewirkung kann ebenfalls zur Identifikation verwertet werden. Das Ausbleiben einer solchen Paranukleinbildung spricht aber nicht gegen die Nukleoalbuminnatur.

Alle übrigen Eigenschaften der Löslichkeit in Alkali, Fällbarkeit mit verdünnten Säuren sind für eine Feststellung nicht verwendbar, da die Nukleoalbumine in dieser Beziehung sich wie manche Nukleoproteide oder Mukoide verhalten. Die Abgrenzung von den letzteren, deren Alkalisalzlösungen keineswegs immer schleimig und fadenziehend sind, ist bisweilen schwierig oder unmöglich, da es ja auch kohlehydrathaltige Nukleoalbumine (Ichthuline) gibt, ebenso wie auch phosphorhaltige Mukoide (Helikoproteid) existieren.

1. Nukleoalbumin aus Rindergalle (sog. Gallenmuzin).

Darstellung nach *Paijkull*[1]: Rindergalle wird mit dem 5fachen Volumen absoluten Alkohols gefällt. Unmittelbar nach vollzogener Fällung wird zentrifugiert. Nach 10 Minuten hat sich ein Niederschlag abgesetzt, so daß man die überstehende Lösung abgießen kann. Der zu einem festen Klumpen zusammengeballte Bodensatz wird herausgenommen, mit Filtrierpapier oberflächlich getrocknet und in Wasser gesteckt. Es entsteht schnell eine opalisierende, schleimig fadenziehende Lösung. Zur Befreiung von gallensauren Salzen fällt man den Körper aus seiner Lösung abermals mit absolutem Alkohol, trennt in der Zentrifuge und löst wieder in Wasser.

Aus dieser wässerigen Lösung fällt man den Körper durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Essigsäure (kein Überschuß!) und dekantiert den Niederschlag gut mit Wasser; dann löst man mit Hilfe von wenig Alkali bis zu neutraler Reaktion und fällt von neuem mit Essigsäure. Dieses Lösen und Fällen wird ein zweites Mal wiederholt. Die zuletzt entstehende, möglichst konzentrierte Lösung wird mit viel Alkohol unter Zusatz von ein wenig Essigsäure gefällt. Der Niederschlag wird dann wochenlang mit 50%igem Alkohol in zu erneuernden Mengen digeriert, bis in dem farblosen Waschalkohol keine Gallensäuren mehr vorhanden sind. Danach trocknet man mit Äther und zuletzt im Vakuum bei 110°.

Das fragliche Nukleoalbumin läßt sich auch aus der Gallenblasenschleimhaut selbst darstellen. Man befreit die abpräparierte Mukosa durch Waschen von anhaftender Galle und extrahiert die Schleimsubstanz, indem man die unbeschädigte innere Oberfläche der Schleimhaut 2 Tage lang mit Wasser in Kontakt beläßt. Die aus solchen Extrakten dargestellte Substanz ist reiner, als das immer noch gelblich gefärbte Präparat aus der Galle selbst.

---

[1]) *L. Z. Paijkull*, Über die Schleimsubstanz der Galle. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 196 (1887).

Eigenschaften. Der Körper hat in seinem Verhalten zu Alkalien und Säuren Muzineigenschaften. Es fehlt ihm aber die für Muzine charakteristische Kohlehydratgruppe. Auch enthält derselbe Phosphor und liefert mit Pepsinsalzsäure ein phosphorreiches Nuklein.

Elementarzusammensetzung: C 50·89, H 6·7, N 16·14, S 1·66%. Der Körper koaguliert in salzfreier Lösung nicht, wohl aber nach Zusatz einer Spur Essigsäure.

2. Dem sog. Nukleoalbumin der Galle schließt sich hier eine kleine Zahl von Körpern an, die, wie die vorbeschriebene Substanz, große äußere Ähnlichkeit mit Muzinen bzw. mit Mukoiden haben, die aber durch ihren Phosphorgehalt und die Erscheinung der Abspaltung eines phosphorreicheren Paranukleins der bisher gültigen Definition eines Nukleoalbumins gerecht werden. Das Interesse, das diesen Körpern gebührt, ist kein geringes, da wir dieselben meist im Gefolge pathologischer entzündlicher Prozesse in Sekreten und Exsudaten auftreten sehen (Harn, Trans- und Exsudate, Synovia). Die Darstellungsweise dieser Substanzen aus Synovia *(Hammarsten)*, Transsudaten *(Paijkull)*, Blasenschleimhaut und Niere *(Lönnberg)* ist einheitlich. Man stellt aus den zerkleinerten Organen kalte oder heiße Wasser- bzw. Alkali- (0·05—0·1%) Extrakte dar und fällt in diesen die muzinähnlichen Körper mit verdünnter Essigsäure. Durch wiederholtes Lösen in ganz verdünntem Alkali und Fällen mit Essigsäure in der oben wiederholt beschriebenen Weise kann man eine Reinigung der Substanz erstreben.

Die Identifikation mit einem sogenannten Nukleoalbumin kann stets nur eine indirekte sein, indem man das Bestehen eines Nukleoproteids durch den negativen Ausfall des Purinbasennachweises und das eines Muzins durch das Fehlen einer reduzierenden Komponente nach vorangegangener Hydrolyse mit 0·3%iger Salzsäure feststellt. Das Auftreten eines „Nukleins" bei der Spaltung mit Pepsinsalzsäure, das sich aus allen „Nukleoalbuminen", aus den genannten Körperflüssigkeiten und Organen isolieren ließ, ist kein definitives Beweismittel für die chemische Natur oder wenigstens chemische Rangordnung des fraglichen Körpers.

I. Die sogenannten **Para- oder Pseudonukleine** der Nukleoalbumine. Generelle Darstellungsmethoden. Man versetzt eine Lösung der zu prüfenden Substanz oder den ungelösten Körper am besten mit einem wirksamen natürlichen Hundemagensaft oder mit einer Mischung von 0·2%iger Salzsäure mit wirksamem käuflichem Pepsin. Das Gemisch oder die Lösung bleibt einige Zeit bei 37° im Brutschrank stehen. (Um zu gleichmäßig zusammengesetzten Körpern zu kommen, wird man wohl stets gleichlange Verdauungszeiten und Konzentrationsbedingungen einhalten, da die Paranukleine keineswegs absolut fermentresistent zu sein scheinen: so sah *Salkowski* bei Verdauung von 1 Teil Kasein mit 500 Teilen Verdauungslösung alles Paranuklein verschwinden, unter Abspaltung des in ihm enthaltenen Phosphors als Phosphorsäure.) Man filtriert nach einer geraumen Zeit den am Boden befindlichen Niederschlag ab, wäscht ihn mit

Wasser aus und unterwirft ihn unter Umständen nochmals einer Verdauung. Alsdann filtriert man das Ungelöste ab und wäscht es bis zum Verschwinden der Biuretreaktion in den Waschflüssigkeiten mit Wasser aus. Man reinigt durch wiederholtes Lösen in einer zur Lösung eben ausreichenden Menge von stark verdünntem Alkali und erneutes Fällen mit verdünnten Säuren. Die letzten Fällungen werden auf dem Filter auf einander folgend mit heißem Wasser, Alkohol und Äther behandelt.

Der qualitative Nachweis eines Paranukleins geschieht durch den Nachweis des Phosphors, das Fehlen von Nukleinbasen und reduzierender Komponenten in den Zersetzungsflüssigkeiten nach Zerkochen mit Salzsäure.

Eventuell beigemengte echte Nukleine können von Paranukleinen dadurch getrennt werden, daß man mit kaltem Barytwasser behandelt. In diesem gehen nur die Paranukleine in Lösung. Aus der Lösung fällt man wieder mit verdünnter Säure und reinigt durch energisches Waschen von den Barytsalzverunreinigungen.

Paranukleine sind dargestellt aus Kasein, Vitellin, Ichthulin und den muzinähnlichen Sekret- und Gewebsnukleoalbuminen.

II. **Paranukleinsäure.** Unter dem Einfluß lange dauernder Ferment-(Pepsin)-hydrolyse oder direkt durch gelinde Hydrolyse mit kaltem Ammoniak können einzelne Nukleoalbumine noch tiefer gespalten werden, wobei neben Albumosen, Peptonen (und Paranuklein) eine Substanz entsteht, die den Namen Paranukleinsäure führt. Der Name ist in Analogie zu dem Zerfall echter Nukleine in Nukleinsäure und Albumosen gewählt und basiert auf der Vorstellung, daß auch Paranuklein sekundär in die besagte Säure und weitere Albumosenbruchstücke zerfallen sollte. Diese Anschauung ist im ganzen wenig begründet, vor allem ist es unbewiesen, ob dieser als Paranukleinsäure bezeichnete Komplex ein primäres Spaltprodukt des „Nukleoalbumins" oder erst ein sekundäres über den Weg des Paranukleins gebildetes Hydrolysenprodukt darstellt.

1. Paranukleinsäure aus Kasein. Darstellung nach *Salkowski*[1]: Man versetzt Caseinum technicum oder purissimum (30 *g*) mit 1 *l* 0·2%iger Salzsäure, in der man vorher 2·5 *g* Pepsin gelöst hat und schüttelt mehrere Stunden in der Schüttelmaschine. Durch Filtration dieser Emulsion gewinnt man ein klares Filtrat, das man mit 0·2%iger Salzsäure auf 2 *l* auffüllt und bei 40° der Verdauung überläßt. Man kann die Verdauung bereits nach 48 Stunden unterbrechen (die Abscheidung eines unlöslichen Nukleins ist weder nach 48 Stunden noch nach Monaten zu beobachten). Das klare Filtrat stumpft man mit Natronlauge oder Natriumkarbonat zu ganz schwach saurer Reaktion ab und dampft zur Hälfte auf dem Wasserbad ein. Dann neutralisiert man ganz und filtriert. Enthält das Filtrat freie Phosphorsäure, d. h. entsteht in einer Probe mit NH_3 und $CaCl_2$ eine Fällung, so versetzt man

[1] *E. Salkowski,* Über die Paranukleinsäure aus Kasein. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **32**. S. 245 (1901).

das ganze Filtrat mit $CaCl_2$ und NH_3, filtriert vom Gefällten Calciumphosphat ab und neutralisiert aufs neue. Die möglichst genau neutralisierte Lösung, in der Menge von zum mindesten 1 *l*, wird mit 200 *cm*³ einer 5%igen Ferriammonsulfatlösung versetzt. Die klare Lösung wird alsdann auf dem Wasserbad oder auf freier Flamme zum Sieden erhitzt. Unter Auftreten einer stark sauren Reaktion scheidet sich ein feinflockiger Niederschlag ab, der sich zusammenballt. Er wird abgesaugt, auf der Nutsche solange mit warmem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser mit HCl und $BaCl_2$ geprüft, absolut klar bleibt, dann mit Alkohol und Äther entwässert.

Der feinste Eisenniederschlag wird mit 100 *cm*³ Wasser in einer Reibschale zu einer Suspension zerrieben und bei Zimmertemperatur mit 80—90 *cm*³ ½ n-NaOH durchgerührt. Es entsteht eine klare Lösung, die erhitzt wird. Sobald sich durch Umsetzung der paranukleinsauren Eisenverbindung mit Natronlauge Eisenhydroxyd abscheidet, filtriert man möglichst schnell heiß in einen Kolben ab, der ¾ der zur Sättigung der angewandten Menge Natronlauge nötigen Essigsäure enthält, so daß in dieser sauren Lösung eine weitere Zersetzung der Nukleinsäure nicht zu befürchten ist. Eine Probe dieser Lösung muß, wenn die Umsetzung gelungen sein soll, mit $Ba(OH)_2$-Wasser alkalisiert, klar bleiben. (Freisein von Phosphorsäure!) Nunmehr fällt man die saure Lösung mit Kupferacetat (5%ige Lösung), solange noch ein Niederschlag entsteht; den sich absetzenden Niederschlag wäscht man durch Dekantieren, bringt ihn in eine Reibschale und entkupfert ihn unter gleichzeitigem Umrühren mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat von CuS wird durch einen Luftstrom von H_2S befreit, auf dem Wasserbad auf 60 *cm*³ eingeengt, filtriert und mit dem mehrfachen Volum absoluten Alkohols versetzt.

Die entstehende Fällung wird auf dem Filter mit Alkohol und Äther entwässert. Sie wird bei 110—115° getrocknet.

Elementarzusammensetzung: C 42·73, H 7·03, N 13·40, P 4·18%. Der Körper gibt Biuretreaktion und ist durch Ammonsulfat fällbar.

Darstellung nach *Reh*[1]): Die klar filtrierte Verdauungslösung wird auf die Hälfte eingeengt und erneut filtriert. Die phosphorsäurefreie Lösung wird mit Essigsäure stark angesäuert und mit einer konzentrierten Lösung von Uranylacetat solange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Nach vollständigem Absitzen filtriert man. Zur Reinigung wird der weiße gelatinöse Niederschlag in 10%iger Salzsäure gelöst und nach dem Filtrieren vom Ungelösten mit Uranylacetat und hierauf bis zu beginnender Trübung mit Natronlauge versetzt. Nun wird bis zu beendeter Fällung konzentrierte Natriumacetatlösung zugesetzt. Diese Prozedur wird mit dem jeweils abfiltrierten Uranniederschlag so oft wiederholt, bis die Filtrate nach dem Natriumacetatzusatz keine Biuretreaktion mehr geben. Der über einem

---

[1]) *A. Reh*, Über die Polypeptidphosphorsäure (Paranukleinsäure des Kaseins). *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 11. S. 1 (1908).

gehärteten Filter auf der Nutsche gesammelte Niederschlag wird durch Auswaschen mit Wasser von Uransalzen und Acetaten befreit, auf Tonplatten getrocknet und zu einem gelblichen Pulver verrieben. Eine Umsetzung dieses Uransalzes in die freie Paranukleinsäure ist bisher nicht ausgeführt.

Elementarzusammensetzung: C 24·04, H 4·0, N 7·59, P 4·27, O 26·84, U 33·33%.

2. Paranukleinsäure aus Vogeleidotter, Avivitellinsäure nach *Levene* und *Alsberg*.[1])

Das rohe oder gereinigte Vitellin wird in Wasser aufgeschwemmt (für das Vitellin aus 100 Eiern genügen 400 cm^3 Wasser) und mit dem halben Volumen einer 25%igen Ammoniaklösung versetzt. Das Gemisch bleibt 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Alsdann neutralisiert man langsam ohne Erwärmung mit Essigsäure (unter Zufügen von Eisstücken!). Nachdem die Reaktion neutral oder nahezu neutral ist, fällt man mit einem Überschuß einer gesättigten Pikrinsäurelösung (100 cm^3) und säuert dann mit Essigsäure stark an. Die Filtrate dieser Fällung werden mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt. Der entstandene abfiltrierte Niederschlag wird in Wasser gelöst und mit Essigsäure angesäuert. In einer kleinen Probe dieser klaren Lösung bestimmt man die Menge 0·5% HCl enthaltenden Alkohols, die als Zusatz nötig ist, um der Probe eine auf Kongo saure Reaktion zu geben. Entsprechend dieser Menge versetzt man die ganze Lösung der gesuchten Substanz mit der berechneten Menge salzsauren Alkohols (0·5%ig). Der gebildete Niederschlag wird auf dem Filter aufeinander folgend mit 50%igem, 80%igem und 95%igem Alkohol bis zur Chlorfreiheit gewaschen und hierauf mit kochendem Alkohol und Äther extrahiert.

Elementarzusammensetzung im Mittel: C 32·31, H 5·58, N 13·13, P 9·88, S 0·33, Fe 0·57%.

3. Hämatogen. Der durch peptische Verdauung von rohem Eidotter gewonnene Körper scheint eine den Paranukleinen des Vitellins ähnliche Substanz zu sein. Die Analogie ist nicht nur durch die Bedingungen seines Entstehens aus einem Vitellin, sondern auch durch die Erscheinung begründet, daß dieses Hämatogen durch gelinde sekundäre Hydrolyse auch weiter in eine Paranukleinsäure gespalten werden kann *(Milroy)*.

Darstellung aus Rohdotter (nicht aus Vitellin) nach *Bunge*.[2]) Man befreit den Dotter von Eiweiß und extrahiert ihn mit Äther. Der ätherunlösliche Rückstand wird in 1‰ HCl gelöst und so lange mit 1‰iger Salzsäure versetzt, bis eine leicht filtrierende, opalisierende Lösung entsteht. Das Filtrat bringt man auf einen Gehalt von 2·5‰iger Salzsäure, fügt wirksames Pepsin hinzu und beläßt die Mischung einige Zeit bei 37°. Der sich alsbald abscheidende, schwach gelblich gefärbte Niederschlag wird zuerst

[1]) *P. A. Levene* und *C. Alsberg*, Zur Chemie der Paranukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 543 (1900).

[2]) *G. v. Bunge*, Über die Assimilation des Eisens. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **9**. S. 49 (1885).

mit 1‰iger Salzsäure, dann mit Wasser ausgewaschen, mit Alkohol ausgekocht und mit Äther extrahiert. Man löst darauf in wässerigem Ammoniak, filtriert und fällt das klare Filtrat mit Alkohol. Diesen Niederschlag wäscht man mit Alkohol aus, suspendiert ihn dann in Alkohol und fügt hierzu Salzsäure bis zu stark saurer Reaktion, dann wäscht man den Niederschlag auf dem Filter nochmals mit heißem Alkohol chlorfrei, digeriert ihn mit Äther und trocknet nach dem Filtrieren im Vakuum und zuletzt bei 110°.

Elementarzusammensetzung: C 42·11, H 6·08, N 14·73, S 0·55, P 5·19, Fe 0·29%.

VII. Muzinsubstanzen.

Man faßt in dieser Gruppe solche Proteine zusammen, die sich, wie man glaubte, proteidartig aus einem Eiweißkomplex und einer Kohlehydratkomponente zusammensetzen. Die neuere Forschung hat nun nachgewiesen, daß diese Zuckerkomponente, die sich erst nach vorangegangener Hydrolyse dieser Proteine durch ihre Reduktionsfähigkeit manifestiert, das Glukosamin ist. Dieses nimmt aber zwischen den Aminosäuren und Kohlehydraten eine Zwischenstellung ein und ist im Protein höchst wahrscheinlich ebenso gebunden, wie die anderen Aminosäuren. Es liegt daher kein Grund vor, in diesen Muzinsubstanzen, etwa in Analogie zu den Nukleoproteiden, einen proteidartigen Aufbau anzunehmen. Insofern ist der bis jetzt übliche Name der Glykoproteide zu verwerfen.[1])

Die äußeren physikalischen Eigenschaften und gerade der Gehalt eines solchen die Reduktion vermittelnden Komplexes aber berechtigen dazu, diese Körper in einer gemeinschaftlichen Gruppe zusammenzufassen. Eine Abgrenzung von den übrigen Proteingruppen gelingt leicht. Gewisse Übergänge scheinen nur zu den schleimartigen Nukleoalbuminen zu bestehen, die vor den meisten Muzinsubstanzen durch den Phosphorgehalt ausgezeichnet sind.

Die Eigenschaften dieser „Glykoproteide" oder besser Muzinsubstanzen, welche für ihre Isolierung verwertbar sind, sind die folgenden: Die Muzinsubstanzen bilden lösliche Alkali- bzw. Erdalkalisalze, können also, wenn sie nicht gelöst als solche in Sekreten vorliegen, dem Gewebe mit schwachen Alkalilösungen entzogen werden. Die echten Muzinalkalisalze bilden in Wasser fadenziehende, schleimige Lösungen. Die Muzinsubstanzen sind ferner in verdünnten Säuren unlöslich, daher durch Fällung ihrer Alkalisalzlösung mit Säuren zu reinigen. Da das Verhalten gegen Säuren variiert, unterscheidet man: echte Muzine, die mit Essigsäure fällbar und in überschüssiger Essigsäure nicht löslich sind, und Pseudomuzine, die aus salzfreier, wässeriger Lösung durch Essigsäure nicht mehr fällbar sind. Zwischen beiden Gruppen stehen die Mukoide bzw. Muzinoide, denen einige der typischen Muzinreaktionen, z. B. die Unlöslichkeit im Essigsäureüberschuß, fehlen.

---

[1]) Vgl. hierzu *Emil Abderhalden*, Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Aufl. S. 191 ff. Urban & Schwarzenberg. Berlin und Wien (1909).

Ferner haben die Elementaranalysen und Ergebnisse hydrolytischer Aufspaltung gelehrt, daß man in der großen Gruppe der Muzine bzw. Mukoide Substanzen unterscheiden muß, welche in ihrem Molekül eine Chondroitinschwefelsäure enthalten, und solche, denen diese Komponente fehlt. Die ersteren werden daher als Chondroproteide bzw. „Chondroglykoproteide" bezeichnet.

Inwieweit es sich bei diesen verschiedenen Schleimsubstanzen um spezifische Organeiweißkörper handelt, steht nicht fest. Es ist denkbar, daß zwischen den Muzinen und Mukoiden Übergangsglieder vorkommen, die nur einen anderen physiologischen Zustand der die Muzinsubstanzen produzierenden Zellen darstellen.

Darstellungsmethoden für:

I. Schleimsubstanzen aus schleimhaltigen Sekreten und Flüssigkeiten.

Muzin im Speicheldrüsensekret, Trachealsekret und Sputum. Mukoid im Serum, Aszites, Harn, Ei, Synovia, Glaskörper. Pseudomuzin aus kolloidem oder flüssigem Ovarialzysteninhalt, Paramuzin aus Gallertinhalt von Kystomen oder malignen Geschwülsten der Ovarien.

1. Darstellung von Speichelmuzin nach *Hammarsten*[1]): Man zerschneidet die frische, von Bindegewebe, Blut und Fett befreite Submaxillardrüse möglichst fein und extrahiert diese mit so viel kaltem Wasser, daß ein dünnflüssiges filtrierbares Extrakt entsteht. Die klaren Wasserextraktfiltrate (Filtrieren durch ein sehr dichtes Filterpapier!), die noch durch Zentrifugieren geklärt werden, versetzt man mit so viel Salzsäure, daß die Lösung 0·1—0·15% davon enthält. Die zuerst reichlich auftretende Muzinfällung löst sich fast sogleich beim Umrühren. Unmittelbar darauf fügt man zu der Lösung das vierfache Volumen destillierten Wassers und rührt mit einem Glasstab gut um. Das Muzin windet sich dabei als zäher Klumpen um den Stab. Durch Umrühren dieser am Stab haftenden Masse in 0·1—0·15%iger Salzsäure wird das Muzin sofort wieder gelöst. Man filtriert dann rasch und fällt wieder durch Verdünnen mit Wasser. Dieses Lösen und Fällen wird ein zweites Mal wiederholt. Das Muzin wird nun mit Wasser durchgeknetet und vollständig gewaschen. Hierbei wandelt sich das Muzin in weiße, gequollene Fädchen um, die zuletzt durch Dekantieren mit Wasser gewaschen werden. Alsdann entwässert man mit Alkohol, behandelt mit Äther nach, zerreibt das Muzin zu einem staubfreien Pulver und erschöpft nochmals mit Alkohol und Äther.

Als Vorbehandlung der Drüsen empfiehlt *Levene*[2]) das folgende Verfahren. Die Drüsen werden sofort nach dem Tode des Tieres in Äther aufbewahrt, dann werden sie in einer Fleischhackmaschine zerkleinert. Den

[1]) *O. Hammarsten*, Über das Muzin der Submaxillardrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 163 (1888).

[2]) *R. A. Levene*, Zur Chemie der Muzine. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **31**. S. 395 (1901).

Gewebsbrei mazeriert man 24 Stunden lang mit destilliertem Wasser, dem man eine größere Menge Chloroform zugesetzt hat. Nach einem Tage filtriert man durch Gaze und schüttelt dann das Filtrat im Scheidetrichter gut mit Äther durch. Nach 24 Stunden haben sich der Äther, das Fett und die Gewebsteile an der Oberfläche abgeschieden. Der untere Teil der Flüssigkeit wird leicht klar filtriert und nach *Hammarsten* auf Muzin verarbeitet.

2. Darstellung aus Trachealsekret und Sputum nach *Fr. Müller.*[1]) Man sammelt das Sputum in Flaschen und versetzt mit 75—80%igem Alkohol. Unter kräftigem Durchschütteln verwandelt sich die Schleimsubstanz in derbe Fäden, die zumeist zu Boden sinken. Das gebildete Sediment bleibt beim Filtrieren durch ein grobmaschiges Koliertuch auf diesem zurück, während die Zellen und feineren Niederschläge das Tuch passieren. Nun schüttelt man die Muzinfäden mit neuen Mengen 75%igem Alkohol durch und koliert von neuem ab. Diese Alkoholextraktion und das Filtrieren wiederholt man mehrfach, schließlich schüttelt man das Muzin in einem großen Kolben mit 0·5%iger Salzsäure durch. Hierbei lockert es sich ein wenig und quillt etwas auf. Nun koliert man abermals oder filtriert ab. Die nun zum größten Teil von Nukleinen bzw. Nukleoalbuminen befreiten Muzinfäden und Muzinkörner werden mit einer sehr verdünnten Salzlösung durchgeschüttelt, wobei das Muzin zu sagoartigen Körnern anquillt, die wiederum auf einem Koliertuch gesammelt werden. Nun schüttelt man die so gewonnene Muzinmasse abermals mit 0·5%iger Salzsäure, wodurch das Muzin wieder fädig wird, koliert ab und wäscht mit Wasser nach. Die letzten Spuren Salzsäure entfernt man mit Alkohol und löst dann die Masse unter häufigem Umschütteln in ganz verdünnter Natronlauge. Diese fadenziehende Lösung filtriert man durch zahlreiche, häufig zu erneuernde Faltenfilter, zentrifugiert von Zellfragmenten ab und fällt durch schwaches Ansäuern mit verdünnter Essigsäure. Die sich abscheidenden Muzinfäserchen bringt man durch Zusatz von 1 Volumen Alkohol zum Zusammenballen und zum Absetzen. Das weiße Präzipitat wird hierauf gegen fließendes Wasser, dann gegen verdünnte Salzsäure, schließlich gegen destilliertes Wasser dialysiert, mit Alkohol entwässert, mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

Elementarzusammensetzung: C 48·27, H 6·91, N 10·8%.

Das Muzin hat die Eigenschaften echten Muzins.

3. Serummukoid. Siehe Bluteiweißkörper, S. 372, Note 2.

4. Ovomukoid. Siehe Proteine des Eies, S. 379.

5. Aszitesmukoid. Darstellung nach *Hammarsten* (vgl. auch S. 412, 6): Man befreit die Flüssigkeit unter Aufkochen und vorsichtigem Zusatz von Essigsäure von koagulablem Eiweiß und engt das vollständig neutralisierte Filtrat auf dem Wasserbad ein. Nachdem man durch Filtration von einigen Eiweißflocken getrennt hat, versetzt man die Lösung bis zu beendeter Fällung mit Alkohol. Den abfiltrierten Niederschlag, der meist

[1]) *Fr. Müller,* Beiträge zur Kenntnis des Muzins und einiger damit verwandter Eiweißkörper. Zeitschr. f. Biol. Bd. **42**. S. 468 (1901).

reichlich Kochsalzkristalle umschließt, preßt man ab und löst ihn abermals in Wasser. In der klar filtrierten Lösung wiederholt man die Alkoholfällung. Den Niederschlag zerreibt man nach dem Abfiltrieren fein mit Alkohol und wäscht ihn gründlich aus. Nach dem Beseitigen des Alkohols löst man ihn in wenig Wasser, dialysiert bis zur Chlorfreiheit der Diffusate und fällt hierauf den Muzinkörper durch Zusatz von Essigsäure aus der leicht opalisierenden Lösung aus. Ein Säureüberschuß ist unschädlich. Nun wäscht man die Fällung mit Wasser, reinigt durch mehrfaches Lösen in sehr verdünntem Alkali und Fällen mit Essigsäure und behandelt nach abermaligem Waschen auf dem Filter mit Alkohol und Äther.

In ganz der gleichen Weise lassen sich auch Mukoide aus serösen Exsudaten und Hydrokelenflüssigkeit isolieren.

Über die Beziehung dieser Körper zu Nukleoalbuminen siehe Seite 405.

6. Synoviamukoid. Darstellung nach *v. Holst.*[1]) Man verdünnt die klare, blutfreie Synoviaflüssigkeit mit dem 3fachen Volumen Wasser und säuert die Lösung mit soviel Essigsäure an, daß der Gesamtgehalt der Säure 1% Essigsäure beträgt. Die grobfaserige Fällung wickelt man durch Umrühren um einen Glasstab, den festhaftenden Klumpen löst man in Wasser unter Zusatz von wenig Alkali, filtriert die Lösung und fällt wiederum mit Essigsäure. Der in dieser Weise mit Essigsäure 3mal gefällte Körper wird mit Alkohol und Äther vollständig erschöpft und bei 110° getrocknet.

Elementarzusammensetzung: C 51·95, H 6·53, N 13·01, S 1·34%.

Die sub 6. genannte Methode kann auch zur Darstellung des Aszitesmukoids (vgl. 5.) verwendet werden.

7. Harnmukoid (nach *Mörner*[2]) stellt eine durch Essigsäure gefällte Muzinsubstanz aus der sogenannten Nubecula des normalen Harnes dar. In den durch Chloroform konservierten, normalen Harnen läßt man die Nubecula absitzen. Der klare Harn wird dann abgehebert und das Sediment auf Filtern gesammelt. Den schleimigen Belag des Filters überträgt man alsbald in verdünnten 95%igen Alkohol. Man fährt mit dem Sammeln dieser Niederschläge fort, bis etwa 250 *l* Harn verarbeitet sind. Das gesammelte Sediment der Alkoholkonservierung verteilt man in Wasser und versetzt die Emulsion mit Ammoniak bis zu eben schwach alkalischer Reaktion. Nachdem der größere Teil der Muzinsubstanz gelöst ist, leitet man in die nicht filtrierte Lösung (Gesamtmenge etwa 1500 cm^3) CO_2 bis zu schwach saurer Reaktion und läßt dann 1—2 Tage in der Kälte stehen. Von der Trübung filtriert man dann durch gutes Filtrierpapier klar ab. Das Filtrat wird hierauf auf einen Gehalt von 0·4% Essigsäure gebracht. Dabei wird die Lösung dickflüssig, bleibt aber im allgemeinen klar. Durch Schütteln derselben mit einer großen Menge Chloroform entsteht alsbald eine flockige Abscheidung,

[1]) *G. v. Holst,* Serosamuzin, eine Muzinsubstanz in Aszitesflüssigkeit und Synovia. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **43**. S. 145 (1904).

[2]) *K. A. H. Mörner,* Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharns. Skand. Arch. f. Phys. Bd. **6**. S. 332 (1895).

die man durch Zentrifugieren sammelt. Das Chloroform wird vorher abgetrennt. Den erhaltenen Niederschlag wäscht man auf dem Filter mit Chloroform gesättigter 0·2—0·4%iger Essigsäure aus. (Bisweilen gehen hierbei nicht unbeträchtliche Muzinmengen eines vielleicht besonderen Muzins in Lösung.) Der säureunlösliche Filterrückstand wird in ganz wenig verdünntem Ammoniak gelöst und mit Essigsäure umgefällt und diese Fällung so oft wiederholt, bis sich das Mukoid als harnsäurefrei erweist. Zuletzt behandelt man die Fällung mit Alkohol und dann mit Äther, zerreibt sie gut mit Äther und trocknet dann im Vakuum über Schwefelsäure.

Das in Essigsäure lösliche Mukoid (vgl. oben die Klammerbemerkung) wird nach dem Einengen seiner neutralisierten Lösung mit säurehaltigem Alkohol gefällt. Der entstehende Niederschlag, dessen Menge sehr wechselnd ist, wird in wenig Wasser gelöst, durch Dialyse von Salzen befreit und in der salzarmen Lösung vereint mit Alkohol versetzt. Hierbei bleibt die Lösung zunächst klar. Durch Zusatz einer geringen Menge wässeriger Kochsalzlösung erzeugt man eine flockige Fällung, welche auf dem Filter mit Alkohol und mit Äther behandelt und im Vakuum getrocknet wird.

Die mittlere Zusammensetzung des Körpers beträgt: C 49·40, N 12·74, S 2·30%. Phosphor ist nur in minimalen Spuren oder gar nicht vorhanden. $(\alpha)_D = -62^0 - 67{\cdot}1^0$. Der Körper zeigt nach erfolgter Säurespaltung eine reduzierende Kohlehydrat- oder kohlehydratähnliche Komponente. Er enthält keine Chondroitenschwefelsäure.

8. Hyalomukoid aus dem Glaskörper des Auges (nach *Mörner*[1]).

Man zerschneidet den Glaskörper mit der Schere, treibt die Masse durch ein Sieb und filtriert durch ein Papierfilter die wasserklare, nicht fadenziehende Flüssigkeit, die mit Essigsäure zunächst keine Fällung gibt. Man verdünnt die Lösung mit 2—3 Vol. Wasser und erhält jetzt durch Essigsäurezusatz eine Fällung, wenn die Mischung etwa 1% Säure enthält. Nach 2 Tagen dekantiert man die über der Fällung stehende, noch trübe Flüssigkeit ab. Der grauweiße, festklebende Bodensatz wird in schwachem Alkali gelöst und durch 2—3maliges Ausfällen aus solcher Lösung mit Essigsäure gereinigt.

Elementarzusammensetzung: N 12·27, S 1·19%.

II. Schleimsubstanzen im Sekret als Hüllensubstanz.

1. Eihüllenmukoid. Darstellung nach *v. Fürth*.[2])

Die Eihülle der Amphibieneier (z. B. Frosch) oder niederer Tiere (z. B. Sepien) bestehen aus „Glukoproteiden". Durch leichten Druck kann man die Eihüllen von den frischen Eiern abtrennen, nachdem man die Spitze der Eihülle angeschnitten hat. Die schleimige Masse, die natürlich

---

[1]) *C. Th. Mörner*, Untersuchungen über die Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. III. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **18**. S. 244 (1894).

[2]) *O. v. Fürth*, Über Glykoproteide niederer Tiere. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 1. S. 252 (1901).

frei von Farbstoffen und Pigmenten sein muß, wird mit Alkohol versetzt, getrocknet und dann mit kochendem Wasser, Alkohol und Äther erschöpft.

Ein Muzin der Sepien zeigte die Zusammensetzung: C 49·70, H 6·96, N 10·75%, erinnert also an das Pseudomuzin (siehe unten), ein Muzin der Froscheihüllen ergab: C 52·7, H 7·1, N 9·3% *(Giacosa)*.

2. Muzin der Schnecke (Mantelmuzin, Fußmuzin[1]).

Mantelmuzin von Helix pomatia (Weinbergschnecke). Man gewinnt das Muzin durch mechanische Reizung der physiologischen Sekretion der Eiweißdrüse. Zu diesem Zweck legt man das äußerlich mechanisch gereinigte Tier in Wasser von 20—30°. Wenn nach geraumer Zeit das Tier den Fuß in ganzer Länge ausgestreckt hat, so umfaßt man den Fuß mit einem Tuch so fest, daß sich das Tier nicht wieder in das Gehäuse zurückziehen kann. Der Teil der Manteloberfläche, an dem der Ausführungsgang der „Eiweißdrüse" sitzt, liegt dann frei. Man reizt denselben mit einem abgerundeten Glasstab, und läßt dann das sich abscheidende, rahmähnliche Sekret sich direkt mit Wasser mischen. Man erhält so eine weißliche, stark schleimige, gequollene Masse. Diese wird mit Wasser zu einer gleichförmigen Emulsion zerrieben, sofort mit überschüssiger Essigsäure versetzt und tüchtig durchgerührt. Das sich in feinen Klümpchen abscheidende Muzin wird auf dem Filter gesammelt, sobald diese im Kontakt der Essigsäure hart und fest geworden sind. Dann zerreibt man sie fein und wäscht durch Dekantieren mit essigsäurehaltigem Wasser, bis sich die Waschwässer, mit oxalsaurem Ammon geprüft, als kalkfrei erweisen. Hierauf entfernt man durch Waschen mit Wasser die Essigsäure und extrahiert den Rückstand mit warmem Alkohol und Äther. (Durch Zusatz von Essigsäure klärt sich die Lösung insofern, als unter CO_2-Entwicklung die anorganischen Anteile in Lösung gehen und sich die muzinähnliche Substanz zu Fasern oder Klümpchen zusammenballt.)

Zur Gewinnung eines unveränderten Muzins ist es zweckmäßig, das frisch sezernierte Mantelmuzinogen nicht zu lange im Kontakt mit Wasser zu lassen. Man verarbeitet zweckmäßig auf einmal je 100 Schnecken und dann sofort das aus ihnen gewonnene Sekret in der beschriebenen Weise.

Diese hier beschriebene Methode zur Darstellung eines Sekretmuzins niederer Tiere dürfte auch für andere, bisher nicht untersuchte Muzine von Weichtieren im Prinzip geeignet sein. In allen Fällen aber muß man sich davon überzeugen, wie die Löslichkeitsverhältnisse des Muzins sind, ehe man an die Darstellung größerer Mengen geht. Auch ist es wichtig, sich im Verlauf der vorzunehmenden Operationen zu überzeugen, daß die Muzinfällungen ihre genuine Löslichkeit bewahrt haben, also keine sekundären Veränderungen erleiden.

Fußmuzin. In Fällen, in denen sich das muzinhaltige Sekret nicht direkt aus dem Drüsenausführungsgang einer isolierten Drüse isolieren läßt,

[1]) *O. Hammarsten*, Studien über Muzin und muzinähnliche Substanzen. *Pflügers* Archiv. Bd. 36. S. 373 (1885).

verwendet man das muzindrüsentragende Gewebsstück als ganzes, indem man dasselbe durch einen Scherenschlag von dem Tiere trennt und mit ganz verdünnter Lauge (0·01—0·02% KOH) in der Kälte extrahiert. (In dieser Weise verfuhr *Hammarsten* zur Isolierung des Schneckenfußmuzins.) Auch hier ist es nötig, sich vor Verunreinigungen mit Gewebeproteinen, die aus der Wundfläche abtropfen können, zu schützen. Man muß diese vor der weiteren Verarbeitung gut mit einem Tuch trocknen. Schließlich ist auf die absolute Freiheit der Muzinlösungen von morphologischen Elementen zu achten. Man muß, um klar filtrierende Lösungen zu erhalten, oft enorm verdünnen, so verdünnte *Hammarsten* das Alkaliextrakt von 60—70 Schnecken mit 9—12 *l* Wasser. Im übrigen ist die Isolierung eines Muzins die für das Mantelmuzin angegebene Methode von *Hammarsten*. Ist man sicher, daß das Muzin relativ alkaliresistent ist, so versucht man die Reinigung durch Lösen in starkem Alkali und Fällen mit Essigsäure.

III. Muzinsubstanzen in pathologischen Sekreten.

1. Pseudomuzin. Für die Darstellung dieses Körpers kommt die von *Hammarsten*[1]) ausgearbeitete Methode in Betracht.

Man fällt eine größere Menge der nach Möglichkeit dünnen und klar filtrierten Zystenflüssigkeit mit dem 2—3fachen Volumen Alkohol. Unter Umrühren mit dem Glasstab windet sich der entstandene Niederschlag um den Glasstab. In dieser Weise wird der Körper sofort aus der sonst noch durch feine Flocken getrübten Lösung herausgenommen, abgepreßt und unter Alkohol fein verteilt. Der Alkohol wird alsdann durch Äther verdrängt und die stark gepreßte Masse nach Verdunsten des Äthers zu einem staubfeinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wird in Wasser zu einer schleimigen Lösung gebracht und, wie oben, erneut mit Alkohol gefällt und mit Äther gereinigt.

Der Körper verliert nach längerem Liegen seine Löslichkeit in kaltem und warmem Wasser, so daß ältere Präparate zu Vergleichszwecken mit einem etwa fraglichen Pseudomuzin nicht verwertbar sind.

Elementarzusammensetzung: C 49·44—50·05, H 6·84—7·11, N 10·26 bis 10·30, S 1·25%.

2. Das Paramuzin findet sich nicht in dem zähschleimigen Zysteninhalt, sondern in der festen, zitternden kolloid- und gallertähnlichen Kystomflüssigkeit der Ovarialkystome (*Mitjukoff*[2]).

Darstellung. Da dieses Rohsekret nicht filtrierbar ist, so bringt man die gesamte Masse (nach Entfernen etwa bluthaltiger Partieen) durch Zusatz von einer beträchtlichen Menge von salzsäurehaltigem Wasser zum Schrumpfen. Das Wasser soll so viel Salzsäure enthalten, daß Kongopapier eben blau gefärbt wird. Die sich nunmehr faserig oder bröckelig abschei-

[1]) *O. Hammarsten*, Metalbumin und Paralbumin. Ein Beitrag zur Chemie der Kystomflüssigkeiten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **6**. S. 194 (1882).

[2]) *K. Mitjukoff*, Über Paramuzin. Inaug.-Dissertation. Bern 1895. Arch. f. Gynäkologie. Bd. **49**. S. 278 (1895).

dende Masse wird nun mit ebenso schwach salzsäurehaltigem Alkohol gewaschen, bis die Waschalkohole ungefärbt (hämatinfrei!) abfließen. Zu diesem Zweck muß die Substanz mit Alkohol innig verrieben werden. Hierauf behandelt man mit absolutem Alkohol, verdrängt den Alkohol mit Äther und trocknet im Vakuum über Schwefelsäure zu einem nun leicht pulverisierbaren Körper.

Zusammensetzung: C 51, H 7·76, N 10·70, S 1·09%.

Unterscheidungsmerkmale von Pseudomuzin und Paramuzin.

Das Paramuzin ist durch Essigsäure und Mineralsäuren aus seinen Lösungen, d. h. den wässerigen Lösungen seiner Alkalisalze fällbar. Das Pseudomuzin wird durch Essigsäure nicht gefällt. Das Paramuzin ist im Überschuß von Essigsäure wieder löslich. Es muß aber bemerkt werden, daß die Artverschiedenheit beider Körper keine absolut gesicherte ist. Die Alkaliempfindlichkeit des Paramuzins ist eine so große, daß möglicherweise schon die Lösung desselben in der zur Lösung nötigen Alkalimenge eine Spaltung herbeiführt, und damit die Bedingung für das vom Pseudomuzin verschiedene Verhalten gegen Essigsäure erfüllt wird.

IV. Schleimsubstanzen als normale Bestandteile zellreicher Gewebe und Organe.

In einer ganzen Reihe von Organen, die selbst keine Schleim sezernierende Drüsen besitzen, sind echte Muzine und Mukoide vorhanden.

Man kennt ein Muzin des Nabelstranges, der Sehnen, ein Mukoid der Cornea und Mukoide der Knorpel, Knochen, Sehnen. Die letzteren zählen durch ihren Gehalt an Chondroitinschwefelsäure zur Spezialgruppe der sog. Chondroproteide. Auch die gallertige Grundsubstanz mancher niederer Tiere, wie die des Gallertschwamms, zählt zu diesen Substanzen.

Prinzipien der Darstellung. Die Isolierung dieser Muzinsubstanzen erfordert eine Extraktion der muzinhaltigen Gewebe. Die Aufgabe der verwertbaren Methode beruht nun darin, das geeignete Extraktionsmittel zu verwenden, das möglichst wenig andere, nicht muzinartige Proteine oder Proteide in Lösung bringt, zugleich aber keine sekundäre Veränderung der in Lösung gehenden Schleimsubstanzen verursacht. Die bisher üblichen Methoden erfüllen nun diese beiden Postulate nicht vollständig, und wenn man die Analysenergebnisse der nach verschiedenen Methoden dargestellten Körper, besonders den variablen Gehalt an Schwefel berücksichtigt, so drängt sich der Gedanke auf, daß die Methoden der Extraktion die Natur und Zusammensetzung der isolierten Substanzen nicht unwesentlich beeinflussen.

Als Extraktionsmittel sind zu verwenden allein oder in sich abwechselnder Kombination: Wasser oder stark verdünnte Alkalilösungen (NaOH oder $Ca(OH)_2$). Bei manchen Organen muß der Extraktion eine vorbereitende Entkalkung mit Säuren vorangehen.

1. Wasserextraktion, verwendbar für Nabelstrangmuzin (*Jernström*[1]):

Aus möglichst frischen Nabelsträngen präpariert man die Gefäße heraus, zerkleinert hierauf das sulzige Gewebe fein und behandelt längere Zeit mit häufig erneuertem, kaltem Wasser. Die gewonnenen vereinigten Lösungen werden filtriert. Durch Essigsäure wird ein fadenziehender Körper gefällt. Ein Überschuß von Essigsäure schadet nicht, da sich der Körper wie ein echtes Muzin im Säureüberschuß nicht löst. Dieser Körper wird in der wiederholt beschriebenen Weise durch Aufwickeln um einen Glasstab aus der Flüssigkeit genommen und durch Lösen in Wasser und Umfällen mit Essigsäure etc. gereinigt. Auch die für das Submaxillarmuzin angegebene Methode ist verwertbar (vgl. S. 410, N. 1).

2. Alkaliextraktion verwendbar für Korneamukoid.[2])

Von der herausgeschnittenen Hornhaut des Rinderauges entfernt man mit einem Hornmesser das Epithel und die *Descemet*sche Membran und zerkleinert die Kornea in der Fleischhackmaschine (man verarbeitet am besten 100—300 Stück). Hierauf schlemmt man den Gewebebrei in einer 0·02%igen Kalilauge oder in 0·02%igem Ammoniak auf. Auf jede Kornea sind 10 cm^3 der Extraktionslösung zu verwenden. Nach 2—3tägiger Extraktion bei Zimmertemperatur trennt man durch Filtration und gewinnt ein klares, dünnflüssiges, nicht fadenziehendes Filtrat. Nun setzt man etwas verdünnte Essigsäure oder verdünnte Salzsäure zu. Der zuerst feinflockige, später gröbere Niederschlag setzt sich nach einem Tag als zusammenhängende Masse ab. Den Bodensatz löst man nach Abgießen der Flüssigkeit mit wenig Alkali zu einer neutral reagierenden Lösung, fällt vereint mit Säure und reinigt durch mehrfache Umfällung und Behandeln mit Alkohol und Äther.

Zusammensetzung: C 50·16, H 6·97, N 12·79, S 2·07%.

Für Chondromukoid nach *C. Th. Mörner*.[3])

I. Man digeriert den zerkleinerten Trachealknorpel mit thymolhaltigem Wasser (½ *l* auf 100 *g* Knorpel) bei 40°. Nach mehreren Tagen trennt man das Wasserextrakt durch Filtration von den Knorpelteilen. Das dickflüssige, aber nicht fadenziehende Filtrat wird bis zu 0·2% mit Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbad erwärmt. Erst bei dem Erwärmen beginnt sich die Flüssigkeit zu trüben und läßt alsbald einen flockigen Niederschlag absitzen. (Der Salzsäurezusatz allein erzeugt wegen der fällungshemmenden Wirkung der Chondroitinschwefelsäure noch keine Niederschlagsbildung!) Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und mehrfach aus seiner Lösung in schwachem Alkali mit Salzsäure grobflockig gefällt.

---

[1]) *E. A. Jernström*, Einige Beiträge zur Kenntnis des Muzins. Upsal. läkaref. Förhandl. Bd. **15**. S. 434 (1880). *Malys* Jahresb. 1880. S. 34.

[2]) *C. Th. Mörner*, Untersuchungen über die Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **18**. S. 213 (1894).

[3]) *C. Th. Mörner*, Chemische Studien über Trachealknorpel. Skand. Arch. f. Phys. Bd. **1**. S. 210 (1889).

Nach dem Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther trocknet man im Vakuum.

II. Darstellung des Mukoids neben Glutin. Man digeriert die fein zu Spänen zerschabten Trachealknorpel kurz mit destilliertem Wasser. Dann digeriert man längere Zeit bei 40° mit 0·1—0·2%iger Salzsäure und filtriert von den glutinhaltigen Digestionsflüssigkeiten ab.

Die zurückbleibenden Knorpelspäne werden kurz mit Wasser von 40° gewaschen und hierauf in 0·05—0·1%iger Kalilauge eingetragen. Hierbei wird das Mukoid herausgelöst. Von dem ungelösten, in Form eines zierlichen Balkennetzes zurückbleibenden Albumoid trennt man durch Filtration. Die Filtrate werden mit Säure gefällt, das ausgeschiedene Mukoid wird, wie oben, weiter gereinigt.

Elementarzusammensetzung im Mittel: C 47·30, M 6·42, N 12·58, S 2·42%. Das Mukoid enthält Chondroitinschwefelsäure als organisch gebundenen Molekülanteil.

3. Extraktion mit Kalkwasser.

Für Sehnenmuzin (Tendomukoid) nach *Cutter* und *Gies*.[1])

Als Ausgangsmaterial dient die Achillessehne des Rindes. Das Gewebe wird sofort post mortem sauber präpariert und fein zerschnitten. Die Stücke werden hierauf mit Wasser gewaschen und der Extraktion mit halbgesättigtem Kalkwasser (2 cm^3 auf 1 *g* Sehne) überlassen. Von Zeit zu Zeit ist die Extraktionslösung gut durchzuschütteln. Das klar filtrierte Extrakt wird mit verdünnter Salzsäure angesäuert, so daß die Lösung 0·2% HCl enthält. Der Niederschlag wird auf Seiden- oder Papierfiltern zuerst mit verdünnter Salzsäure, dann mit Wasser eiweiß- bzw. salzsäurefrei gewaschen. (Die Waschflüssigkeiten dürfen keine Biuretreaktion geben und müssen chlorfrei sein.) Nun wiederholt man Lösung in verdünnter Lauge, Fällen mit verdünnter Salzsäure und ausgiebiges Waschen, und reinigt dann, zur Entfernung von Extraktivstoffen und von Fett, mit großen Mengen heißen Alkohols und Äthers. Man trocknet im Vakuum.

Elementarzusammensetzung: C 47·47, H 6·68, N 12·58, S 2·41%.

Die Einheitlichkeit des so dargestellten Körpers ist fraglich. Die Sehnen enthalten anscheinend mehrere Mukoide.

Für Knochenmukoid (Osseomukoid) nach *Hawk* und *Gies*.[2])

Die Femurknochen frisch geschlachteter Tiere werden sofort aus dem Gewebe und Periost herauspräpariert, durch Ausspülen mit fließendem Wasser während 24 Stunden vom Knochenmark befreit und nach dieser Zeit nochmals sorgfältig durch Abschaben von Bindegewebsresten gereinigt. Nunmehr entkalkt man, indem man die Knochen mehrere Stunden in einer einigemal erneuerten Lösung von 0·2—0·5%iger Salzsäure liegen

---

[1]) *W. D. Cutter* und *W. J. Gies*, Das Muzin des weißen, fibrösen Bindegewebes. Journ. exp. Med. I. S. 186 (1896). — Die Zusammensetzung des Sehnenmukoids. Amer. Journ. of Phys. Vol. 6. p. 155 (1901).

[2]) *P. B. Hawk* und *W. J. Gies*, Chemische Studien über Osseomukoid mit Bestimmung der Verbrennungswärme etc. Amer. Journ. of Phys. Bd. 5. S. 387 (1901).

läßt. Danach schabt man die oberflächlich entkalkten Schichten mit einem scharfen Skalpell ab. Dann wiederholt man die Entkalkung für einige Stunden und schabt wiederum die Knochensubstanz ab. Also fährt man fort, bis nur noch eine kleine dünne Knochenlade vorhanden ist. Das durch Abschaben gewonnene Produkt, das man in einer 0·2%igen Salzsäure gesammelt hat, wird dann vereinigt (1700 *g* aus 24 Femurknochen in 14 Tagen gewonnen), mit fließendem Wasser chlorfrei gewaschen und dann unter häufigem Schütteln mit halbgesättigtem Kalkwasser extrahiert (2—5 cm^3 Lösung auf 1 *g* Knochensubstanz). Die Extraktion setzt man 48 Stunden lang fort. Nach dieser Zeit filtriert man und fällt das Filtrat mit 0·2%iger Salzsäure.

Die weitere Reinigung erfolgt in der für Sehnenmukoid beschriebenen Weise.

V. Schleimsubstanzen als Gewebseinlagerung (Amyloid).

1. Mechanisch isoliertes Amyloid (*O. Hanssen*[1]). Man zerschneidet die amyloid degenerierten Milzen in Lamellen und drückt aus diesen die Sagokörner mit der Pinzette oder dem Skalpell heraus. Den gesammelten Brei schüttelt man längere Zeit auf der Schüttelmaschine mit destilliertem Wasser. Dann verdünnt man die Lösung mit Wasser, so daß sich die Amyloidkörner aus der Suspension zu Boden senken. Durch Dekantieren trennt man den Bodensatz von der Gewebsfetzensuspension, dann reinigt man durch häufiges Aufrühren und Dekantieren mit Wasser. Die letzten Gewebsfetzen werden mit der Pinzette entfernt. Es hinterbleibt das Amyloid zuletzt in Form homogener, runder oder elliptischer Körner. Man wäscht dieselben mit destilliertem Wasser, trocknet bei 40°, pulverisiert und trocknet abermals im Vakuum über Schwefelsäure.

Das so dargestellte intakte Amyloid enthält keine Chondroitinschwefelsäure. Das intakte Amyloid ist also mit der nach *Krawkow* isolierbaren Substanz nicht identisch. Diese ist ein durch die Verdauung verändertes, durch andere Körper gewiß auch verunreinigtes Amyloid.

2. Amyloid nach *Krawkow*.[2]) Die amyloid entartete Leber oder Milz (oder normales Aortengewebe) wird von der Kapsel und von Gefäßen befreit und dann gut zerkleinert. Den Gewebebrei rührt man zuerst mit kaltem Wasser und hierauf mit schwachem Ammoniak an. Nach einigen Stunden gießt man die NH_3-haltige Lösung ab und zerreibt den Rückstand durch ein dichtes Nickeldrahtnetz. Die zerriebene Masse wird mit verdünntem Ammoniak angerührt und mit dieser oft erneuerten Lösung durch Dekantieren so lange gewaschen, bis die Waschflüssigkeiten klar und farblos geworden sind. Die letzten Filtrate müssen auch frei von Chondroitinschwefelsäure

[1]) *O. Hanssen*, Ein Beitrag zur Chemie der amyloiden Entartung. Biochem. Zeitschr. Bd. **13**. S. 185 (1908).

[2]) *A. P. Krawkow*, Beiträge zur Chemie der Amyloidentartung. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **40**. S. 195 (1898).

sein. (Man prüft auf diese Säure, indem man diese Probe mit verdünnter Salzsäure kocht und danach auf die Anwesenheit einer durch Hydrolyse abgespaltenen Schwefelsäure mit Baryumchlorid prüft.)

Nach der Ammoniakbehandlung wäscht man den Gewebsrückstand mit Wasser und unterwirft ihn einer 4tägigen Verdauung mit wirksamem Magensaft (Infus einer Magenschleimhaut mit 0·4%iger Salzsäure). Der unverdaute Rückstand, der aus Amyloid und Nukleinen besteht, wird zuerst mit schwacher Salzsäure, dann mit Wasser auf dem Filter ausgewaschen. Hierauf versetzt man die Masse mit sehr verdünnter Ammoniaklösung, in welcher sich das durch Verdauung wohl irgendwie veränderte „Amyloid" nunmehr zum größten Teil auflöst. Aus der filtrierten ammoniakalischen Lösung fällt man mit verdünnter Salzsäure einen reichlichen, flockigen — bisweilen auch gallertigen — Niederschlag, den man einer zweiten Pepsinsalzsäureverdauung unterwirft. Den unverdauten Rückstand bringt man auf ein Filter, wäscht mit Wasser aus, löst ihn in Ammoniak und fällt wiederum mit Salzsäure. Den Niederschlag sammelt man auf einem Filter, wäscht ihn mit Wasser frei von Ammonsalzen und behandelt ihn mit einer verdünnten Barythydratlösung. Hierdurch geht das Amyloid in Lösung und wird durch Filtration von ungelösten Nukleinresten getrennt. Aus der Barytlösung fällt man wiederum mit Säure und behandelt den abfiltrierten Niederschlag mit Wasser, Alkohol und Äther.

Das so dargestellte Amyloid ist kein intaktes Gewebsamyloid. Im Gegensatz zu dem nach *Hanssen* dargestellten Körper enthält er Chondroitinschwefelsäure, ist also, so weit sich beurteilen läßt, nicht rein.

Die Elementarzusammensetzung ist im Mittel: C 46·92, H 6·60, N 14·16, P 1·16%.

Analytisch sind sehr inkonstante Werte gefunden worden. Es ist wahrscheinlich, daß auch der hohe Phosphorgehalt die Folge einer Beimengung eines Nukleoproteids ist.

Nachweis von Amyloid in Organen. Man versetzt das Rohorgan oder einen dünnen Schnitt desselben *a)* mit Jod: es entsteht eine rötlichbraune bis violette Färbung, *b)* mit Jod und Schwefelsäure: es entsteht eine violette bis blaue Färbung, *c)* mit Methylviolett: es bildet sich eine rote oder rötliche Farbe. Die Jodreaktionen fallen nicht bei allen Amyloidorganen positiv aus.

Anmerkung: Ein großer Teil der hier beschriebenen Proteine sind auf ihren Gehalt an Aminosäuren untersucht worden. Vergleiche hierüber die Zusammenstellung bei *Emil Abderhalden:* Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Aufl. S. 233 ff. Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien, 1909. Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der speziellen Eiweißchemie. S. 74 ff. Gustav Fischer, Jena 1909.

β) Albuminoide.

Von **William J. Gies**, New-York und **Eduard Strauß**, Frankfurt a. M.

Die Zusammenstellung der sogenannten Albuminoide in einer besonderen Gruppe läßt sich heute nur noch durch den Hinweis rechtfertigen, daß sie sich zumeist als Gerüstsubstanzen der tierischen Organismen charakterisieren lassen, sowie, daß sie sich alle durch eine besonders hohe Resistenz gegenüber denjenigen Agentien auszeichnen, welche die nativen Eiweißkörper leicht lösen und verändern. Aus diesem letzteren Gesichtspunkt ergibt sich schon ganz allgemein für ihre Darstellung bzw. Isolierung, daß man die Ausgangsmaterialien auf einander folgend mit verschiedenen eiweißlösenden Agentien (Säure, Alkali, Verdauungsfermente) zu behandeln hat, um zu den eigentlichen Albuminoiden zu gelangen. Daß die hierbei erhaltenen Substanzen nicht unbedingt einheitlich sein können, ist sicher. Da wir eine chemische Einteilung dieser Gruppe veränderter Eiweißkörper nicht zu geben vermögen, weil sie ja nach den Untersuchungen *Fischers*[1]), *Abderhaldens*[2]) und ihrer Mitarbeiter sicherlich in chemischer Beziehung die größten Verschiedenheiten aufweisen, befolgen wir in dieser Darstellung eine Einteilung nach rein zoologischen Gesichtspunkten. Wir schildern demnach zuerst die Darstellung der Albuminoide der Wirbellosen, sodann die der Albuminoide der Wirbeltiere.

A. Albuminoide der Evertebraten.

I. Das Spongin.

Spongin ist die von den protoplasmatischen Elementen befreite Gerüstsubstanz der Spongien, und zwar speziell die des Badeschwammes, der Euspongia.

Zur Reindarstellung des Materials verfährt man folgendermaßen (*Strauß*[3]): Die Schwämme werden in sehr kleine Stücke geschnitten, durch Klopfen von Staub und Konkrementen möglichst vollständig befreit

---

[1]) Vgl. *E. Fischer,* Untersuchungen über Aminosäuren etc. Berlin 1906.

[2]) Vgl. *E. Abderhalden,* Lehrbuch der physiol. Chemie. 2. Aufl. Berlin 1909.

[3]) *E. Strauß,* Studien über die Albuminoide usw. Winter, Heidelberg 1904.

und sodann mit Wasser gut gespült. Die Schwammstücke werden nun 3—4 Tage lang in der Kälte mit einer 10—15%igen, jeden Tag gewechselten Salzsäure digeriert. Nach gutem Abpressen der Säure werden die Stücke zuerst mit heißem, dann mit kaltem Wasser abgespült, bis die Salzsäure verschwunden ist, sodann mit Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen und getrocknet. Zur Reinigung der Kakospongien ist die 5tägige Verwendung einer 20%igen Salzsäure nötig. Die verbleibende feste, schwarze, faserige Masse wird mit Wasser völlig ausgewaschen und dann noch 2 Tage lang mit kalter 5%iger Kalilauge digeriert. Verfährt man sodann, wie oben geschildert, weiter (Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther), so erhält man schließlich das Spongin in erwünschter Reinheit.

Über die Resultate der Totalhydrolyse des Spongins vgl. [1]) und [2]).

II. Das Cornein und das Gorgonin.

Cornein nennt man nach *Valenciennes*[4]) die organische Grundsubstanz der Korallen. *Krukenberg*[3]) hat das Cornein dargestellt, indem er Achsenskelette von Ripidogorgia flabellum, Gorg. verrucosa, Antipathes mit verdünnter Salzsäure entkalkte, dann mit Alkohol, Äther, Pepsin, Trypsin, 10—20%iger Natronlauge digerierte und schließlich mit Wasser abspülte. Einfacher ist die Methode zur Darstellung des von *Drechsel*[5]), später von *Henze*[6]) untersuchten Gorgonins, der albumoiden Grundsubstanz von Gorgonia Cavollini. Die Gorgonia Cavollini ist eine Weichkoralle, deren rote Polypenmasse sich leicht mechanisch von dem hornartigen Achsenskelett abtrennen läßt, welches sodann in lufttrockener Form zu den Untersuchungen dient.

Zur Reinigung des Gorgonins verfährt man folgendermaßen: Die Gorgoninstücke werden zuerst einem Prozesse zur Entfernung der verschiedenen anhaftenden Substanzen, speziell der unorganischen Stoffe unterworfen. Nach vorläufigem Aufweichen in 1%iger Essigsäure und sorgfältiger Behandlung mit einer rauhen Bürste und darauf folgendem Ab-

---

[1]) *E. Abderhalden* und *E. Strauß*, Die Spaltprodukte des Spongins mit Säuren. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 49 (1906).

[2]) *A. Kossel* und *F. Kutscher*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 214 u. 205 (1901).

[3]) *Valenciennes*, Extrait d'une monographie de la famille des Gorgonides de la Classe des Polypes. Comptes rendus de l'Acad. des sciences de Paris. T. **41**. p. 11 (1855).

[4]) *Krukenberg*, Cornein. Vgl. Studien. I. Reihe. 5. Abt. S. 2—16 (1881). — Derselbe, Über das Cornein. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **17**. S. 1843—1846 (1884). — Derselbe, Vorträge. S. 209—211 (1886). — Derselbe, Fortgesetzte Untersuchungen über Skeletine. Zeitschr. f. Biologie. Bd. **22**. S. 251—254 (1886).

[5]) *E. Drechsel*, Beiträge zur Chemie einiger Seetiere. I. Über das Achsenskelett von Gorgonia Cavollini. Über das Jod im Gorgonin. Die Leibessubstanz der Gorgonia. Zeitschr. f. Biologie. Bd. **33**. S. 90—107 (1896).

[6]) *M. Henze*, Zur Chemie des Gorgonins und der Jodgorgosäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **38**. S. 60 (1903) u. Bd. **51**. S. 64 (1907).

spülen mit Wasser ist das Coenenchyma vollständig entfernt. Das Skelett wird sodann mit 1%iger Essigsäure in Gegenwart von Toluol bei 40° C extrahiert. (Halogenwasserstoffsäure ist zu vermeiden, wenn man in dem Produkt das Jod bestimmen will.) Die Säure wird in Zwischenräumen von einigen Tagen erneuert, bis die Extrakte kein Calcium mehr enthalten. Diese Reinigung wird längere Zeit fortgesetzt und schließlich durch Dialyse vervollständigt.

III. Albuminoide im Gerüst der Röhrenwürmer.

Aus den Hornröhrchen des Röhrenwurmes Onuphis tubicola gewann *Schmiedeberg*[1]) neben einem kohlenhydratartigen Körper, dem Onuphin, durch wiederholte Extraktion der Röhrchen mit Salzsäure und Kalilauge ein Albuminoid in Form von lockeren, papiermachéartigen Lamellen. Dieses Albuminoid stellt von den 42·39% organischer Substanz, welche die lufttrockenen Onuphisröhrchen enthalten, 3·84% dar. Auch in den Röhren der lederartigen Hülle von Spirographis Spalanzanii hat *Schmiedeberg* neben einem onuphisartigen einen Albuminoidbestandteil nachgewiesen. Er isolierte denselben durch aufeinander folgende Behandlung mit Alkalilauge und Salzsäure. *Krukenberg*[2]) bezeichnete die nach dem Auskochen der Spirographishülle mit Wasser hinterbleibende, durch Trypsin nicht verdauliche Substanz als Spirographin. Er löste diese Substanz in starkem Alkali und erhielt bei der Neutralisation der Lösung ein weiteres Produkt, das Spirographein, welches beim Erhitzen mit Wasser unter Druck albumoseartige Produkte und Brenzkatechin lieferte (?).

IV. Das Conchiolin.

Mit dem Namen Conchiolin bezeichnet *Frémy*[3]) die Gerüstsubstanz der Lamellibranchiaten. Diese Substanz ist von *Schloßberger*[4]), später von *Wetzel*[5]) untersucht worden und sicher nicht einheitlich.

Löst man nach *Schloßberger* die Muschelschale in verdünnter Salzsäure, so unterscheidet man an dem ungelöst bleibenden Schalenteil nach

---

[1]) *O. Schmiedeberg*, Über die chemische Zusammensetzung der Wohnröhren von Onuphis tubicola Mueller. Mitteilungen a. d. Zool. Station zu Neapel. Bd. **3**. S. 373—392 (1882).

[2]) *E. Krukenberg*, Vgl. Studien. I. Reihe. 5. Abt. S. 28—30 (1881). — Derselbe, Zur Kenntnis der organischen Bestandteile der tierischen Gerüstsubstanz. Vgl. Studien. II. Reihe. 1. Abt. S. 49—58 (1882).

[3]) *E. Frémy*, Recherches chimiques sur les Os. Comptes rendus de l'Acad. des sciences de Paris. T. **39**. p. 1053—1058; Journ. f. prakt. Chemie. Bd. **64**. S. 263 (1854); Annales de Chimie (3). T. **43**. p. 96—99 (1855).

[4]) *O. Schloßberger*, Zur Kenntnis der Muschelschalen des Byssus und der Chitinfrage. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **98**. S. 99—120; Journ. f. prakt. Chem. Bd. **68**. S. 162 (1856).

[5]) *G. Wetzel*, Über die Spaltungsprodukte des Conchiolins. Zentralbl. f. Physiol. Bd. **13**. S. 113—114 (1899). — Derselbe, Die organischen Substanzen der Schalen von Mytilus und Pinna. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **29**. S. 388 (1900).

dem Aufschwemmen mit Wasser zweierlei Substanzen: 1. Braune, derbe, etwas durchscheinende Häute, die nach dem Waschen und Trocknen graugelb erscheinen, ziemlich kohärent und fast undurchsichtig sind und 2. weißgraue, schleimige Flocken.

Wetzel verwandte zu seinen Untersuchungen die Schalen der Miesmuschel Mytilus edulis, und zwar der im Mittelmeer lebende Varietät galloprovincialis und die Schalen der riesigen roten Steckmuschel Pinna nobilis. Aus den Schalen der letzteren erhält man nach der Entkalkung mit verdünnter Salzsäure zwei verschiedene Produkte, welche mit den von *Schloßberger* erlangten beiden Produkten große Ähnlichkeit aufweisen.

Aus den Schalen von Austern erhält man das Conchiolin in folgender Weise: Fein zertrümmerte Schalen werden mit 0·3%iger Salzsäure entkalkt. Die Säure wird häufig erneuert, bis die Extrakte nur noch schwache Spuren von Calcium aufweisen. Die Säure wird sodann zum größten Teil rasch weggewaschen und der organische Rückstand in Gegenwart von Toluol 24 Stunden lang der Einwirkung 1%iger Natronlauge unterworfen. Der Rückstand wird mehrmals zum Zwecke der Entfernung der anhaftenden löslichen Substanzen einschließlich Alkali mit Wasser gewaschen und dann in einer 0·25%igen Sodalösung über Nacht bei 40° der tryptischen Verdauung unterworfen. Der größte Teil der anhaftenden löslichen Substanzen und der Soda wird alsdann mit Wasser entfernt und der Rückstand unter Einwirkung von Pepsinsalzsäure (0·2%) über Nacht bei 40° digeriert. Der Rückstand wird nun abermals mit 0·1%iger Salzsäure von Eiweiß frei gewaschen und in Wasser unter Toluol dialysiert, bis er vollständig säure- und calciumfrei geworden ist. Dieses Produkt, eine Mischung der beiden „Conchioline", wird jetzt mit warmem Alkohol und Alkoholäther gewaschen und schließlich mit Äther in einem Soxhlet-Apparat zur vollständigen Entfernung von Lipoidsubstanzen extrahiert. Das trockene Material ist gewöhnlich eine harte bräunliche Masse, welche leicht zu einem feinen Pulver zerrieben werden kann.

V. Der Byssus.

Der Byssus ist die Substanz, mit welcher sich die Acephalen an Fremdkörper anheften. Er ist offenbar das Sekret einer Byssusdrüse und besteht aus braunen Fäden. Gereinigt wird er am einfachsten durch Auswaschen mit Wasser und mehrmaliges Spülen mit Alkohol und Äther. Angaben über seine Löslichkeit in Mineralsäuren und Laugen hat *Schloßberger*[1]) gemacht.

Bei der Totalhydrolyse des Byssus von Pinna nobilis L. fand *E. Abderhalden*[2]) Folgendes: Der Byssus enthält viel Glykokoll und l-Tyrosin.

[1]) *J. Schloßberger*, Zur Kenntnis der Muschelschalen, des Byssus und der Chitinfrage. Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. 98. S. 109—114 (1856).

[2]) *E. Abderhalden*, Die Monoaminosäuren des „Byssus" von Pinna nobilis L. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55. S. 236 (1908).

ferner d-Alanin, l-Asparaginsäure und auffallend viel Prolin. Vorhanden sind höchstwahrscheinlich Valin, Leucin und Phenylalanin.

VI. Die Seide.

Die Seide ist ein von Lepidopterenraupen behufs Bildung der Kokons abgesondertes Sekret. Am eingehendsten untersucht ist die Seide von Bombyx mori, dem Seidenspinner. Das Sekret selbst läßt sich darstellen, indem man frische Seidendrüsen mit 15%iger Pottaschelösung mazeriert. Man erhält hierbei eine Flüssigkeit, die beim Schütteln ein Gerinnsel absetzt. Dieselbe Erscheinung tritt auch unter Luftabschluß ein, besser aber bei Gegenwart von Sauerstoff (*Dubois*[1]). Trägt man den Seidensaft in Alkohol ein, so erstarrt er (*Bolley*[2]). Durch Auskochen mit Wasser läßt sich die Seide in zwei Teile zerlegen, das Fibroin, welches unverändert zurückbleibt, und den Seidenleim (Sericin), welcher in Lösung geht. Zur Darstellung des Fibroins verfährt man in folgender Weise (Methode von *Cramer*, modifiziert von *Emil Fischer*[3]): Man erhitzt gelbe Rohseide oder technisch degommierte Seide in einem 5 *l* fassenden Porzellantopf von der Form eines Becherglases in einem Autoklaven mit der 25fachen Menge Wasser 3 Stunden auf 117—120°. Diese Operation wird 1—2mal wiederholt, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfindet. Bei technisch degommierter Seide genügt zweimaliges Kochen mit Wasser. Die Menge des rückständigen Fibroins beträgt 68·5% der angewandten Rohseide.

Das Fibroin kann zur weiteren Reinigung 24 Stunden lang in 1%iger Salzsäure eingeweicht werden. Sodann wird es mit Wasser vollständig frei von Sericin und Säure gewaschen, mit Alkohol entwässert und schließlich mit Äther in einem Soxhletapparat von Lipoiden befreit (*Bondi*[4]).

Nach *Fischers* Angaben besitzt derartig dargestelltes Fibroin wesentlich andere Eigenschaften als dasjenige, welches nach *Städeler*[5]) durch Behandlung mit 5%iger Natronlauge entsteht.

Die Resultate der Totalhydrolyse vgl. bei *Fischer* und *Skita*.[3])

Der Seidenleim (Sericin) wird nach *Cramer*[6]) gewonnen, indem man die durch Auskochen gelber Rohseide mit Wasser über 100° erhaltene Lösung noch warm mit basischem Bleiacetat fällt, den Niederschlag abfiltriert und auswäscht, bis das Filtrat bleifrei ist, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelblei abfiltriert und das Filtrat mit Alkohol fällt. Die

---

[1]) *R. Dubois*, Sur la sécrétion de la soie chez Bombyx mori. Compt. rend. T. **111**. p. 206 (1890).

[2]) *Bolley*, Zur Genesis der Seide. Journ. f. prakt. Chem. Bd. **93**. S. 347 (1864).

[3]) *E. Fischer* und *A. Skita*, Über das Fibroin der Seide. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 177 (1901) und Bd. **35**. S. 221 (1902).

[4]) *S. Bondi*, Studien über Seidenleim. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **34**. S. 481 (1902).

[5]) *G. Städeler*, Untersuchungen über Fibroin, Spongin und Chitin. Annal. f. Chem. u. Pharm. Bd. **111**. S. 12—16 (1859).

[6]) *E. Cramer*, Über die Bestandteile der Seide. Journ. f. prakt. Chem. Bd. **96**. S. 76—77 (1865).

ausgefallenen weißen Flocken werden mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet (*Wetzel*[1]). Nach *Fischer*[2]) (loc. cit.) stellt man den Seidenleim als Rohprodukt in der Weise dar, daß man gelbe lombardische Rohseide 2mal mit 125 Teilen Wasser jedesmal 3 Stunden im Autoklaven im großen Porzellanbecher auf 118° erhitzt und dann die wässerige Lösung eindampft. Die Ausbeute an Rohprodukt beträgt ungefähr 25% der Rohseide und stellt eine dunkle glasige, leimähnliche Masse dar.

Nach *Bondi* (loc. cit.) gewinnt man Seidenleim auch in folgender Weise: Die Seidenkokons werden mit der Schere geöffnet und von den Puppen befreit, hierauf sorgfältig von den ihnen noch anhaftenden Verunreinigungen und Puppenresten gesäubert. Kokons, die nicht vollständig davon zu befreien sind, werden nicht verwandt. Die Seidenkonkons werden 2 Tage mit gewöhnlichem Wasser und dann in 1%igen Salzsäurebädern geweicht, in welchen sie 24 Stunden liegen bleiben. Nach dem Abgießen der Flüssigkeit werden die Kokons, solange noch Säurereaktion nachweisbar ist, in fließendem Leitungswasser, nach dem Verschwinden der Säurereaktion mit oft zu wechselndem destillierten Wasser chlorfrei gewaschen.

Nun wird durch Kochen der Kokons mit Wasser, am besten in einem Glaskolben mit Rückflußkühler, das Sericin in Lösung gebracht. Bei gleichzeitiger Verarbeitung größerer Mengen kann auch in einem emaillierten oder verzinkten Metallkessel gekocht werden. (Vgl. *Fischers* Angaben.) Es ist darauf zu achten, daß durch öfteres Zuführen von Wasser das Flüssigkeitsniveau sich stets auf der gleichen Höhe hält, da sonst an den Kesselwänden über der Flüssigkeit schwer lösliches Sericin sich festsetzt.

Die Kokonmenge wird zwei- oder dreimal, aber immer nur eine Stunde gekocht; durch längeres Kochen kann die Gelatinierfähigkeit des Sericins beeinträchtigt werden. Beim Kochen wird 20- oder 30mal soviel Wasser verwandt, als das Gewicht der trockenen Kokons beträgt. Der Versuch, ein viertes Mal die Kokons zu kochen, ist wertlos, denn die dabei erhaltene Lösung enthält nur noch 1—2‰ Sericin.

Die heiße Lösung wird von den Kokons abgegossen und durch ein Wärmefilter filtriert, da beim Erkalten leicht fein verteilte Ausscheidungen entstehen. Das Filtrat wird in Porzellanschalen auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand haftet der Schale in Form von spröden gelbbraunen Lamellen an und lassen sich dieselben am besten mit einem Metallspatel herunternehmen. Er wird in der Reibschale zerrieben und stellt dann ein gefärbtes grobes Pulver dar, welches sich zur weiteren Reinigung besser eignet als größere Stücke, indem es den Reinigungsflüssigkeiten eine viel ausgiebigere Einwirkung gestattet.

Je 30—40 *g* des gepulverten Seidenleims werden in einem Becherglas mit einem Liter destillierten Wassers übergossen, mit einem Rührer

[1]) *G. Wetzel*, Ein Beitrag zur Kenntnis der in der Seide enthaltenen eiweißartigen Stoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **26**. S. 535—542 (1899).

[2]) *E. Fischer*, Nachtrag zur Hydrolyse des Caseins und Seidenfibroins durch Säuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 155 (1908).

vorsichtig aufgerührt und einen Tag lang mit dem Wasser in Berührung gelassen. Nach dem Abgießen der Flüssigkeit wird der Vorgang unter erneutem Wasserzusatz 2—3mal wiederholt. In ähnlicher Weise wird der so gewaschene Leim mit 1%iger Kalilauge durch zwei Tage behandelt, worauf Waschen mit destilliertem Wasser, einmalige kurzdauernde Waschung mit verdünnter Essigsäure behufs Neutralisation des Alkalis und schließlich mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser folgen. Der Seidenleim quillt bei der Reinigung sehr stark. 2—3 Tage langes Stehenlassen unter täglich gewechseltem Alkohol bringt das Präparat wieder auf das ursprüngliche Volumen. Hierbei geht schon ein Teil des Farbstoffes in den Alkohol über. Die vollständige Befreiung von färbenden Bestandteilen gelingt durch einstündiges Kochen mit 70—80%igem Alkohol. Um die geringe Menge des anhaftenden Fetts sowie den Alkohol vollständig zu beseitigen, wird das Pulver noch mehrere Tage mit wasserfreiem Äther extrahiert. Nach dem Verdunsten des Äthers erhält man das reine Sericin in Form eines nicht mehr oder nur noch wenig gefärbten Pulvers. Dieses Produkt ist jedoch ein Gemisch der in Wasser leicht löslichen Sericin-Modifikation und der schwer löslichen Modifikation, welche durch das Eindampfen entstanden ist. Zur Isolierung des leicht löslichen Sericins wird eine kleine Menge des Pulvers in einem Glaskolben mit Steigrohr mit der 20fachen Menge Wasser auf dem Wasserbad 2 Stunden lang erhitzt. Die Flüssigkeit wird noch heiß abfiltriert und nach dem Erkalten mit einer mehrfachen Menge Alkohol gefällt. Nach 24 Stunden läßt sich die überstehende Flüssigkeit größtenteils vom Niederschlag abgießen. Gut ist es, den Niederschlag noch weitere 24 Stunden mit absolutem Alkohol stehen zu lassen und erst dann zu filtrieren. Man wäscht mit wasserfreiem Äther nach und bringt den nach Abtropfen der Flüssigkeit konsistenter gewordenen Niederschlag in ein Schälchen, digeriert mit wasserfreiem Äther, gießt diesen ab und bringt nun das Schälchen zum Eintrocknen in eine Glasglocke über Chlorcalcium. Nach Verlauf einer Woche lassen sich die durch starkes Schrumpfen entstandenen weißen Schollen zerreiben. Der Seidenleim wird stets in Form eines ungefärbten Pulvers erhalten, welches in heißem Wasser vollständig löslich ist. Diese Lösung gibt alle Reaktionen des Seidenleims und bildet nach dem Erkalten bei genügender Konzentration eine feste Gallerte.

Bondi gibt auch folgende ökonomischere und raschere Methode an: Man setzt dem Dekokt der Seidenkokons (welches 0·5—1 *l* betragen mag) vorsichtig, am besten kubikzentimeterweise, 1%ige Essigsäure zu. Nach Zusatz jedes Kubikzentimeters rühre man um und warte einige Zeit. Hat man genug Essigsäure zugesetzt (4—8 cm^3), so findet eine Abscheidung des Seidenleims statt. Er setzt sich in Form größerer Flocken zu Boden, während die überstehende Flüssigkeit klar und farblos wird.

Durch tagelanges Dekantieren des Niederschlages mit destilliertem Wasser kann man ihn von der Essigsäure und auch noch von viel Asche befreien. Den hierbei ziemlich gequollenen Flocken läßt sich durch Über-

gießen mit Alkohol und mehrmaligen Wechsel desselben sehr viel Wasser entziehen. Auskochen in Alkohol nimmt den Farbstoff fort. Die noch mit Äther behandelte Masse läßt man dann über Chlorcalcium eintrocknen. Es entsteht ein farbloses Produkt, welches zu Pulver zerrieben wird. Das Pulver gleicht, soweit es bisher untersucht wurde, der leicht löslichen Modifikation des Seidenleims: es ist in heißem Wasser löslich, die Lösung gibt die Reaktionen des Seidenleims und erstarrt bei genügender Konzentration zu einer Gallerte.

Kurz erwähnt sei hier, daß auch aus sogenannter wilder Seide in ähnlicher Weise Fibroin und Sericin gewonnen worden sind (*Bolley*[1]), *Bastow* und *Appleyard*[2]).

E. Abderhalden und *Auguste Rilliet*[3]) haben in neuester Zeit die „New-Chwang"-Seide untersucht und das rohe Gespinst folgendermaßen gereinigt: Zuerst wurde die ungefärbte Seide mechanisch durch Zerzupfen und Ausschütteln von Staub und sonstigen Beimengungen sorgfältig befreit. Dann wurde das Gewicht der Seide festgestellt und nunmehr der Seidenleim durch Auskochen mit Wasser in einem Porzellangefäß im Autoklaven (vgl. *Fischers* Methode) entfernt. Das Wasser wurde so lange erneuert, bis beim Eindampfen kein erheblicher Rückstand mehr blieb. Etwas ging immer noch in Lösung. Es scheint, daß das Seidenfibroin trotz aller Vorsichtsmaßregeln — Anwendung von destilliertem Wasser und Benutzung eines Porzellangefäßes — beim Erhitzen mit Wasser unter Druck angegriffen wird. Die Seide verlor nach viermaligem, 3—5stündigem Auskochen mit je 3—4 *l* Wasser 20% Leim, beim Trocknen bei 120° verlor sie durchschnittlich 10% an Gewicht. Sie enthielt ca. 5% Asche, in welcher Eisen, Calcium, Phosphorsäure und Salzsäure qualitativ nachgewiesen werden konnten.

Erwähnt sei noch die Untersuchung von *Emil Fischer* über die Zusammensetzung der Seide der Spinne Nephila madagascariensis.[4])

Gleichfalls erwähnt werden möge ein Produkt des Follikelepithels des Ovariums von Bombyx mori, welches *Tichomiroff*[5]) darstellte, indem er es von anderen morphologischen Beimengungen durch Digerieren mit 0·1% Salzsäure, sodann durch Erwärmen auf dem Wasserbad und nachfolgende Verdauung mit Pepsinsalzsäure befreite.

---

[1]) *Bolley*, Untersuchungen über Jama-may-Seide. Journ. f. prakt. Chemie. Bd. **108**. S. 364 (1869).

[2]) *E. Bastow* und *J. R. Appleyard*, Zur Chemie der Tussaseide. Chemiker-Zeitung. Bd. **12**. S. 209 (1888).

[3]) *E. Abderhalden* und *Auguste Rilliet*, Die Monaminosäuren der „New-Chwang"-Seide. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **58**. S. 337 (1909).

[4]) *E. Fischer*, Über Spinnenseide. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **53**. S. 137 (1907).

[5]) *A. Tichomiroff*, Chemische Studien über die Entwicklung der Insekteneier. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **9**. S. 518 u. 566 (1885).

B. Die Albuminoide der Vertebraten.

I. Das Kollagen und der Leim.

Das Kollagen bildet die Hauptmenge der die Bindegewebszellen umgebenden Grundsubstanz im lockeren Bindegewebe, in den Fascien, Bändern, ferner die organische Grundsubstanz der Knochen und einen Teil derselben in der Kornea und in den Fischschuppen.

1. Zur Darstellung von Knochenkollagen verwendet man am besten Schenkelknochen des Ochsen. Dieselben werden sorgfältig auf mechanischem Wege zunächst von den anhaftenden Geweben und vom Periost befreit und die reinen Knochen sodann durch Eintauchen in große Mengen verdünnter Säure (0·1—0·2%ige Salzsäure) entkalkt. Stärkere Säuren bewirken leichtere Zersetzlichkeit des Kollagens. Nach 6stündiger Einwirkung der Säure ist besonders bei gelegentlichem Umrühren der Säure die Oberfläche der Knochen merklich entkalkt, und durch Abkratzen mit einem gewöhnlichen Skalpell können lange Stücke elastischer Späne von Ossein erhalten werden.

Durch abermaliges Eintauchen in frische Säure wird eine weitere Schicht entkalkt; der Prozeß kann zweimal im Tage wiederholt und so weit geleitet werden, daß der Knochen vollständig entkalkt und in Osseinspäne umgewandelt ist. Die ersten drei oder vier Portionen der Osseinspäne sollten aus dem weiteren Gang der Präparation ausgeschaltet werden, um sicher zu gehen, daß alle anhaftenden Stoffe entfernt sind. Jede Portion der Späne muß in einer Fleischmaschine zerkleinert und von den unorganischen Stoffen durch Behandeln mit 0·05—0·01%iger häufig erneuerter Salzsäure oder durch Dialyse in Salzsäure oder durch beides befreit werden. Diese Behandlung zur Entfernung aller oder nahezu aller unorganischen Substanzen ist zu der nun folgenden vollständigen Entfernung des Mukoids nötig. Nach Sammlung der gewünschten Menge des mit Säure gewaschenen Osseins muß dieses vom Osseomukoid befreit werden.[1]) Dies geschieht am besten in der Weise, daß man zuerst die Substanz wiederholt einige Tage mit viel Wasser wäscht, bis alle Säure entfernt ist, und sie dann in verschlossenen Flaschen einer Extraktion mit einem großen Überschuß von 0·05—0·1%iger Natronlauge (10—15 cm^3 Lösung pro Gramm) unterwirft. Zu den Extrakten setzt man Toluol zu, schüttelt kräftig und erneuert das Alkali mehrere Male in einem Zwischenraum von 48—72 Stunden. Das verdünnte Alkali entfernt nicht nur alles Osseomukoid, sondern auch anhaftende Spuren von Nukleoprotein- und Hämoglobinzersetzungsprodukten; es verändert das Osseokollagen nicht. Man entfernt sodann elastische Fasern, Osseoalbumoid[2]), Rückstände von Blutgefäßen etc., indem man das Ossein

[1]) *Hawk* und *Gies*, Chemical studies of osseomucoid, with determinations of the heat of combustion of some connective tissue glucoproteids. American Journal of Physiol. Vol. 5. p. 387 (1901). — *Seifert* und *Gies*, On the distribution of osseomucoid. Ibid. Vol. **10**. p. 146 (1903).

[2]) *Hawk* und *Gies*, On the composition and chemical properties of osseoalbumoid, with a comparative study of the albumoid of cartilage. Americ. Journ. of. Physiol. Vol. 7. p. 340 (1902).

der Einwirkung einer stark aktiven Trypsinalkalilösung (0·25% Soda) bei 38—40% unterwirft. (Dieser Prozeß darf nicht vor der Entfernung des Osseomukoids in Anwendung kommen.) (Vgl. *Posner* und *Gies*.[1]) Die Digestion wird 4—5 Tage unter Gegenwart von Toluol mit täglicher Erneuerung der Trypsinflüssigkeit fortgesetzt.

Am Ende des tryptischen Verdauungsprozesses, der das Kollagen nicht merklich beeinflußt, ist das Ossein frei von allen Proteinen mit Ausnahme des Osseokollagens selbst. Die schuppigen Teile besitzen trotzdem noch fast alle ihre ursprünglichen Eigenschaften. Man reinigt dieselben von verschiedenen Digestionsprodukten sorgfältig durch wiederholtes und langes Auswaschen, zuerst mit großen Mengen von 0·05%iger Salzsäure und dann mit Wasser in Gegenwart von Toluol. Nun wird das säurefreie Produkt an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet. Die gelben Schuppen werden dann gepulvert. Das gepulverte Material wird in Wasser aufgeweicht und wieder mehrmals in 0·05%iger Salzsäure gewaschen und in Säure dialysiert — beides in Gegenwart von Toluol —, bis in den Außenwässern der Dialyse keine unorganischen Bestandteile mehr nachweisbar sind. Das Pulver wird sodann aufeinander folgend mit Alkohol, Alkoholäther und schließlich mit Äther behandelt, um Lipoide zu entfernen und es zu entwässern. Die Ätherextraktion muß sorgfältig ausgeführt werden, da in den Partikeln beträchtliche Mengen von ätherlöslicher Substanz zurückbleiben. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, bildet das Endprodukt ein weißes oder gelbliches Pulver. (*Gies* hat gefunden, daß in dieser Weise präparierte Produkte eine Elementarzusammensetzung haben, welche praktisch mit der des Sehnenkollagens identisch ist; auch hat er beobachtet, daß die Elementarzusammensetzung des Glutins aus Sehnenkollagen praktisch dieselbe ist, wie die des Glutins aus Osseokollagen.) (Nicht veröffentlicht.)

2. Zur Darstellung von Sehnenkollagen wählt man am besten als Ausgangsmaterial die Achillessehne des Ochsen. Das Material wird von anhaftendem Gewebe sorgfältig befreit und in sehr dünne transversale Stücke geschnitten. Zur Zerkleinerung ist es nötig, lange scharfe und sehr dünne Messer zu verwenden. Die groben Stücke werden nun zunächst mit Wasser blutfrei gewaschen. Will man gleichzeitig das Sehnenmukoid aus den folgenden Alkaliextrakten erhalten, so ist es nötig, diesen Waschprozeß in verschlossenen Flaschen unter Gegenwart von Toluol vorzunehmen, bis kein Hämoglobin oder koagulables Eiweiß mehr ausgezogen werden kann (*Posner* und *Gies*[2]). Sodann werden die Stücke einer ca. 4 Tage dauernden Extraktion mit einer täglich mehrmals gewechselten 0·05—0·1%igen Natronlauge unter Toluolzusatz unterzogen, um so noch anhaftende Spuren von Blut und Lymphe zu entfernen und das Sehnenmukoid abzutrennen. Letzteres erhält man aus diesem Extrakt durch Behandlung mit einem

[1]) *Posner* und *Gies*, Vorläufige Untersuchung über die Verdaulichkeit des Bindegewebsmukoids in Pepsinsalzsäure. Americ. Journ. of Physiol. Bd. **11**. p. 330 (1904).

[2]) *Posner* und *Gies*, Verbinden sich die Mukoide mit anderen Proteinstoffen? Americ. Journ. of Physiol. Vol. **11**. p. 404 (1904).

mäßigen Überschuß von 0·2%iger Salzsäure (*Cutter* und *Gies*[1]). Elastische Fasern (*Bürger* und *Gies*[2]). Überbleibsel von Blutgefäßen etc. werden sodann in derselben Weise, wie oben für das Ossein beschrieben, durch tryptische Verdauung entfernt, wobei auch hier die Sehnenstücke ihr Aussehen nicht verändern. Zu Ende des tryptischen Prozesses hinterbleibt nichts außer Sehnenkollagen. Nun werden die Sehnenstücke in der Fleischhackmaschine zerkleinert. (Dieses darf wegen des leichten Zusammenballens des Materials in alkalischen Flüssigkeiten erst an dieser Stelle vorgenommen werden.) Das Material wird jetzt durch lang anhaltendes Waschen mit Wasser und schließliche Dialyse von allen anhaftenden Substanzen befreit. In dieser Form kann es, wie auch das beschriebene Osseokollagen, zur Darstellung des betreffenden Glutins dienen. Nach sorgfältiger Entfernung unorganischer Stoffe wird das faserige Kollagen sorgfältig mit Alkoholäther und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es besteht schließlich aus einer schneeweißen Masse sehr dünner Fasern. Das so erhaltene Produkt hat angenährt dieselbe Elementarzusammensetzung und Verbrennungswärme, wie das daraus dargestellte Sehnenglutin (*Manning* und *Gies*[3]), *Emmet* und *Gies*[4]).

3. Aus Sehnen läßt sich das Kollagen nach *Sadikoff*[5]) auch gewinnen, wenn man die fein zerhackten Sehnen mit schwacher Alkalilösung behandelt, mit kaltem Wasser wäscht und die Masse mit einem Glasstab unter Wirbelbewegungen schlägt. Man kann dabei die ganze Kollagenmenge um den Glasstab zusammenwinden.

4. Aus der Hornhaut des Auges erhält man das Collagen nach *Mörner*[6]) in folgender Weise: Man schneidet den mit der Hornhaut zusammenhängenden Teil der Sehnenhaut ab, schabt das Epithellager und die *Descemet*sche Haut mit einem Hornmesser ab, zerkleinert die aus Grundsubstanz bestehenden Scheiben in der Fleischhackmaschine und extrahiert in schwacher Alkalilösung (0·02% Kalilauge oder 0·02—0·2% Ammoniak, in Partien von 100—300 Stück) 2—3 Tage lang bei Zimmertemperatur. Sobald die Reste bei öfterem Wechsel der Flüssigkeit keine durch Essig-

[1]) *Cutter* und *Gies*, The composition of tendon mucoid. Americ. Journ. of Physiol. Vol. **6**. p. 155 (1901).

[2]) *Bürger* und *Gies*, The chemical constituents of tendinous tissue. Americ. Journ. of Physiol. Vol. **6**. p. 219 (1901).

[3]) *Manning* und *Gies*, Proceedings of the society for experimental Biology and Medicine. Vol. **4**. p. 160 (1907).

[4]) *Emmet* und *Gies*, Relation of Collagen and Gelatin. Proceedings of the American society of Biological Chemistry. Vol. **1**. p. 42 (1907). — Journal of Biological Chemistry. Vol. **3** p. 33. (1907). — American Journal of Physiol. Vol. **19**. p. 11 (1907). — Vgl. auch *F. Hofmeister*, Über die chemische Struktur des Kollagens. Zeitschr. f. physiol. Chem. Vol. **2**. p. 299—322 (1878). – Ferner: *Gies*, Proceedings of the American Chemical Society, Biologial Section, Science. Vol. **24**. p. 463 (1907).

[5]) *W. L. Sadikoff*, Untersuchungen über tierische Leimstoffe. V. Mitteil. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 130—139 (1906).

[6]) *C. Th. Mörner*, Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **18**. S. 213—256 u. S. 61—106 (1894).

säure fällbare Substanz mehr abgeben, werden sie durch Behandlung mit destilliertem Wasser erst bei Zimmertemperatur, später bei 30—40° vollständig von Alkali befreit. Die reinweiße gleichartige Masse kann nun durch stundenlanges Erwärmen mit destilliertem Wasser bei 105—111° in eine klare dünnflüssige, bei Abkühlung gelatinierende Lösung verwandelt werden oder aber durch Alkohol- und Ätherbehandlung zur Trockne gebracht werden.

Die Kollagene gehen durch Lösen in siedendem Wasser in Glutine über, welche bei Zimmertemperatur zu Gallerten erstarren.

1. Sehnenglutin. Zur Darstellung des Glutins aus Sehnen verwendet man das Sehnenkollagen, welches in der bereits beschriebenen Weise dargestellt ist und unterwirft es vor seiner Behandlung mit Alkohol und Äther (*Tebb*[1]) direkt der Einwirkung von Wasser. Das Wasser wird zweckmäßig mit einer sehr geringen Menge Salzsäure angesäuert (*Emmett* und *Gies* loc. cit.). Das Gemisch wird nun am Rückflußkühler gekocht. In Intervallen von einer Stunde gießt man die Lösung ab und ersetzt sie durch frisches, schwach angesäuertes Wasser. Dieser Prozeß wird fortgesetzt, bis alles Kollagen in Glutin übergegangen ist. Die Glutinlösung wird nun möglichst neutralisiert, durch rasche Verdampfung auf dem Wasserbad stark eingeengt und schließlich mit soviel Alkohol versetzt, daß eine reichliche aber unvollständige Fällung entsteht. Es bilden sich stets während des Umbildungsprozesses des Kollagens in Glutin Glutosen. Wenn die gerade eben nötige Menge von Alkohol zur Fällung des Glutins angewendet wird, so bleibt die größte Menge der Glutinosen in Lösung. Zweckmäßigerweise löst man die Niederschläge abermals in Wasser und fällt nochmals mehrere Male wie beschrieben. Von der letzten Fällung filtriert man die Lösung durch ein Heißwasserfilter und dialysiert einige Tage lang unter Gegenwart von Toluol gegen fließendes Wasser. Zur endgültigen Fällung ist es am besten, den Niederschlag in möglichst wenig Wasser unter Erwärmung zu lösen, so daß eine dicke visköse Lösung entsteht. Läßt man dieselbe ein wenig erkalten und gießt sie sodann in dünnem Strahl in ein 15—20faches Volumen 90—95%igen Alkohols, so erstarrt die Masse und das ganze Glutin verwandelt sich in eine voluminöse weiße fibröse Masse, welche sich an einen Stab beim Rühren anhaftet und so aus der Alkoholflüssigkeit herausgenommen werden kann.

Diese so gewonnenen Glutinstreifen wäscht man sodann mit frischem Alkohol, welcher sie etwas steifer und härter macht. Sodann extrahiert man sie wiederholt mit Äther zur Entfernung von Lipoiden und Alkohol und trocknet sie schließlich im Vakuumexsikkator. (*Van Name*[2], *Sadikoff*[3]).

2. Reinigung nach *Mörner*. Zur Reinigung der käuflichen Gelatine dient folgende Vorschrift: Die Gelatinescheiben werden während einiger

[1]) *Tebb*, Journal of Physiology. Vol. 27. p. 463 (1892).
[2]) *Van Name*, Journal of experimental Medicine. Vol. 2. p. 117 (1897).
[3]) *W. L. Sadikoff*, Untersuchungen über tierische Leimstoffe. I. II. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 39. S. 396—422 (1903).

Tage mit ätherhaltigem destilliertem Wasser (zu antiseptischen Zwecken) ausgewaschen, dann mit Kalilauge (von einem bis ein paar Zehntel Prozent) während einiger Wochen, oder bis das Glutin so locker geworden ist, daß bei einem Durchsieben ein nennenswerter Verlust eintritt, danach mit destilliertem Wasser, sehr verdünnter Essigsäure und schließlich wieder mit destilliertem Wasser behandelt. Das Auswaschen findet bei Zimmertemperatur statt, die Erneuerung der Extraktionsflüssigkeit — 1 *l* auf 25—30 *g* Glutin — geschieht täglich oder jeden zweiten Tag, wobei die Gallerte vermittelst eines porzellanenen Siebes gesammelt wird. Nachdem die stark gequollene Gelatine mit Alkohol gehärtet worden ist (gewöhnlich ist zwei- bis dreimalige Erneuerung des Alkohols erforderlich), erhält man die Gelatinmasse in erstarrtem Zustande. Sie kann, falls der spezielle Zweck dies benötigt, wiederum durch Lösen in warmem Wasser, Filtrieren und Fällen mit Alkohol, Trocknen, Pulverisieren, Extraktion mit Äther usw. behandelt werden. Als Endprodukt erhält man bei diesem Verfahren ein Glutin, welches eine beachtungswerte Garantie für die Abwesenheit nahezu jeder Verunreinigung darbietet, — ausgenommen einen gewöhnlich nicht hochgradigen (0·25—0·75%) Gehalt an mineralischen Bestandteilen — und das zugleich keiner chemischen Veränderung unterzogen worden ist. Wünscht man das demgemäß von organischen fremden Stoffen befreite Glutin möglichst aschearm darzustellen, so wird in der Wärme eine starke (10—15%) wässerige Lösung bereitet und behufs Gelatinierens abseits gestellt. Die Gallerte wird in dünne Scheibchen zerschnitten, welche Wochen hindurch mit reichlichem, oftmals erneuertem (ätherhaltigem), destilliertem Wasser ausgewaschen werden. Der Gehalt an Asche kann hierdurch von 1·87% in der ursprünglichen Gelatine auf 0·16—0·13% im Glutinpräparat herabgesetzt werden *(Mörner)*.[1])

3. Knochenglutin nach *Sadikoff*. Eine Methode zur Reindarstellung des Glutins gibt *Sadikoff*[2]) an: Nicht entfettete Knochen werden zerkleinert, eventuell zu einer breiartigen Masse zerquetscht. Der Brei wird dann mit Salzsäure (1:3) so lange behandelt, als noch Salze extrahiert werden können. Dies geschieht unter Umrühren und mehrmaligem Wechsel der Säure. Die auf der Oberfläche sich abscheidende Fettschicht wird abgehoben und die hyaline Masse, die nach 7—8 Tagen ziemlich vollständig von Salzen und Fett befreit ist, einigemal mit kaltem Wasser nachgewaschen und in eine 1—3%ige Lösung von Natronlauge eingetragen. Hierbei lösen sich alle Albuminstoffe, Mucin, Nucleoproteide usw. Außerdem geht eine Verseifung der geringen noch anhaftenden Fettreste vor sich, und Überreste des phosphorsauren Calciums fallen aus. Nach dreimaligem Wechsel der Alkalilösung und kurzem Nachwaschen mit Wasser sind alle eventuell noch anhaftenden Eiweißsubstanzen und Seifen beseitigt. Die Glutinmasse wird in

[1]) *C. Th. Mörner*, Beitrag zur Kenntnis einiger Eigenschaften des Glutins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 28. S. 471—523 (1899). (Mit ausführlichem Literaturverzeichnis.)

[2]) loc. cit.

eine siedende 1%ige Lösung von Monochloressigsäure gebracht: hierbei wandelt sich die leimgebende Substanz in den Leimstoff um. Die heiße konzentrierte Lösung wird durchgeschlagen, eventuell abfiltriert, mit Magnesiumsulfat ausgesalzen und mit kaltem Wasser und Alkohol von Säuren und Salzen befreit.

4. Reinigung nach *Sadikoff*. Eine weitere Reindarstellung des normalen Glutins schildert der genannte Autor (loc. cit.) in folgender Vorschrift: Glutin wird mit kaltem Wasser, darauf mit kalter 20%iger Lösung von Magnesiumsulfat gewaschen, dann unter Erwärmung auf dem Wasserbad in 20%iger Magnesiumsulfatlösung gelöst und heiß filtriert. Nach dem Erkalten wird ohne vorheriges Filtrieren 0·5%ige Mineralsäure, welche in 20%iger Magnesiumsulfatlösung bereitet ist, hinzugegeben. Die voluminöse Fällung wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, dann in heißem Wasser gelöst, abgekühlt und mit schwacher Salzsäure versetzt, wobei die Gesamtkonzentration der Salzsäure 1% nicht übersteigen darf. Man gibt dann 3—4 Volumina starken Alkohols hinzu, so daß der Leimstoff in 70—80%igem Alkohol gelöst ist. Man schlägt das gesamte Glutin durch Neutralisation mit Ammoniak nieder, läßt absitzen, gießt den Alkohol ab und wäscht mit Wasser oder Alkohol nach.

Vgl. über die Totalhydrolyse des Leims *Fischer, Levene* und *Aders*[1]), *Abderhalden*[2]), *E. Hart*[3]) und *E. Fischer*.[4])

Das Reticulin, welches möglicherweise nur ein verändertes, schwerer in Glutin überführbares Kollagen ist (*Tebb*[5]), stellte *Siegfried*[6]) aus der Mukosa des Schweinedünndarmes dar.

Schweinedünndarm wird in der Fleischhackmaschine fein zermahlen und sodann mit Wasser und 0·25%iger Sodalösung gewaschen, bis keine säurefällbaren Substanzen mehr entfernt werden können. Nun wird die Masse bei Gegenwart von Toluol mehrere Tage lang einer intensiven tryptischen Verdauung unterworfen. Die Verdauungsrückstände werden mit Wasser und Alkohol gewaschen und in einem Soxhlet-Apparat mehrere Tage mit Äther extrahiert. Nach Wiederholung der Behandlung mit Trypsinalkali, Wasser, Alkohol und Äther hinterbleibt eine leichte, graue, faserige Masse. Dieses Material wird zunächst mit kochendem Wasser eine halbe Stunde lang behandelt, wobei es schnell seine Struktur verliert und, während ein Teil als Glutin in Lösung geht, in ein körniges lockeres Produkt verwandelt wird.

---

[1]) *E. Fischer, P. A. Levene* und *R. H. Aders*, Über die Hydrolyse des Leimes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35. S. 70 (1902).

[2]) *E. Fischer* und *E. Abderhalden*, Notizen über die Hydrolyse von Proteinstoffen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42. S. 540 (1904).

[3]) *E. Hart*, Über die quantitative Bestimmung der Spaltungsprodukte von Eiweißkörpern. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23. S. 347 (1901).

[4]) *E. Fischer*, Über das Fibroin und den Leim der Seide. loc. cit.

[5]) *Tebb*, Journ. of Physiol. Vol. 27. p. 463 (1892).

[6]) *Siegfried*, Habilitationsschrift. Leipzig 1892. — Sitzungsberichte d. sächs. Ges. d. Wissensch. 1892. — Journ. of Physiol. Vol. 28. p. 319 (1893). — *Halliburton*, Ten lectures on biochemistry of muscle and nerve. p. 54. London 1904.

Diese Behandlung wird so lange fortgesetzt, bis sich kein Glutin mehr löst, der endgültige Rückstand gegen Wasser dialysiert und mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

II. Das Elastin.

Das Elastin ist die Grundsubstanz des elastischen Gewebes, besonders des zu einem derben Strang entwickelten Ligamentum nuchae. Es findet sich auch in den Wänden der Gefäße, besonders der Aorta und in Form von Einzelfibrillen im gewöhnlichen Bindegewebe eingelagert. *Horbaczewski*[1]) unterwarf zur Reingewinnung des Elastins das Nackenband folgenden Prozeduren:

Zuerst wird dasselbe in kleine Stücke geschnitten, 3—4 Tage mit Wasser ausgekocht, dann mit 1%iger Kalilauge digeriert, und abermals mit Wasser ausgekocht, dann mit 1%iger Essigsäure behandelt, mit Wasser ausgekocht, mit 5%iger Salzsäure 24 Stunden lang digeriert, mit Wasser gewaschen und schließlich mit Alkohol und Äther erschöpfend extrahiert. Diese letzte Extraktion dauert, wenn sie vollkommen sein soll, 2 Wochen lang, selbst wenn man das Material vorher pulverisiert hat.

Nach *Richards* und *Gies*[2]) verfährt man zur Darstellung des Elastins aus dem Ligamentum nuchae folgendermaßen:

Das Nackenband wird in Streifen geschnitten, diese in der Fleischhackmaschine möglichst fein zerkleinert und die Masse in Gegenwart von Toluol 24—48 Stunden gut mit Wasser gewaschen. Das so gereinigte Gewebe führt man nun in große verschlossene Flaschen über und unterwirft es 48—72 Stunden lang der Extraktion mit einem großen Überschuß von kaltem halbgesättigtem Kalkwasser (unter Toluolzusatz). Diese Extraktion wird mehrfach wiederholt und schließlich das Alkali durch sorgfältiges Waschen mit Wasser entfernt. Die Substanz wird dann mit wiederholt erneutem kochendem Wasser behandelt, bis nur noch Spuren gelösten Eiweißes (Elastose) im Waschwasser auftreten. Nun wird zunächst wenige Stunden mit kochender 10%iger Essigsäure, sodann gleich lange Zeit mit 5%iger Salzsäure bei Zimmertemperatur extrahiert. Diese Extraktion wird alternierend wiederholt und der Rückstand durch Wasser und nachherige Dialyse säurefrei gewaschen. Schließlich wird das Produkt mit kochendem Alkohol und Äther ausgezogen und getrocknet. So gewonnene Elastinpartikel können leicht in einem Mörser zu einem cremefarbigen Pulver zerrieben werden.

Zur Darstellung des Elastins aus Arterien bedient man sich am besten der Aorta des Ochsen. Dieselbe wird fein zerkleinert, zuerst mit kaltem

---

[1]) *J. Horbaczewski*, Über das Verhalten des Elastins bei der Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 6. S. 330 (1882).

[2]) *Richards* und *Gies*, Chemical studies of elastin, mucoid and other proteids in elastic tissue with some notes on ligament extractives. American Journal of Physiol. T. 7. p. 93 (1902).

Wasser und dann mehrere Stunden mit häufig erneuertem kochendem Wasser behandelt. Die Rückstände werden sodann 1 oder 2 Tage lang unter Toluolzusatz mit 0·25%igerSodalösung digeriert, mit schwach angesäuertem Wasser gewaschen und 48 Stunden lang der Einwirkung einer starken Pepsinsalzsäurelösung ausgesetzt, welche bei Beginn des zweiten Tages erneuert wird. Hierauf wird der Rückstand mit ganz schwach alkalischem Wasser (Soda) gewaschen und nach sorgfältigem Auswaschen 6 Stunden lang mit oft erneuertem Wasser (am Rückflußkühler) gekocht. Nach dem Filtrieren und Waschen mit Wasser wird die so erhaltene Substanz bei 100° getrocknet, in kleine Stücke gebrochen und der beschriebene Prozeß wiederholt. Bei diesem Prozeß werden Kollagen, Muskelelemente und andere nicht elastinartige Substanzen entfernt. Aber außer dem Elastin befindet sich in der Aorta noch eine andere Proteinsubstanz, welche dem Elastin in ihrem Widerstand gegen obigen Reinigungsprozeß gleicht, und welche sehr schwer zu entfernen ist. Zu ihrer Beseitigung bedient man sich folgender Methode: Das trockene Material wird fein gepulvert und das Pulver so lange mit großen Mengen häufig erneuerten kochenden Wassers behandelt, als noch organische Substanz in Lösung geht. Die ungelöste Masse wird dann 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit 5%iger Salzsäure behandelt, durch Wasser und darauf folgende Dialyse von der Säure befreit und mit kochendem Alkohol entwässert. Schließlich wird das Produkt 3 Tage lang mit täglich gewechseltem Äther extrahiert, um Fettsubstanzen zu entfernen. Das trockene Elastin ist ein braungelbes Pulver (*Schwarz*[1]).

Vgl. die Resultate der Totalhydrolyse des Elastins bei *Abderhalden* und *Schittenhelm*[2]), *H. Schwarz*[3]), *Kossel* und *Kutscher*[4]) und *Mörner*.[5])

III. Die „Albumoide“ und Keratoelastine.

a) In der Linse des Auges fand *Mörner*[7]) ein „Albumoid“ in einer Menge von 17% der frischen Linse. Dargestellt wird es in folgender Weise: Durch fleißiges Umschütteln der in einer Glasflasche enthaltenen Linsen mit $^1/_4$ gesättigter Kochsalzlösung werden die Linsenfasern Schicht für Schicht in der Flüssigkeit aufgeschlemmt. Durch Filtrieren wird das lösliche Eiweiß zum größten Teil entfernt, worauf die auf dem Filter gesammelte Linsenmasse in einer reichlichen Menge Kochsalz aufgeschlemmt

[1]) *H. Schwarz,* Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit der elastischen Substanz der Aorta. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **18**. S. 487—507 (1894). — Vgl. auch *Bergh,* Untersuchungen über die basischen Spaltungsprodukte des Elastins beim Kochen mit Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **25**. S. 337 (1898).

[2]) *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm,* Die Abbauprodukte des Elastins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **41**. S. 293 (1904).

[3]) *H. Schwarz,* loc. cit.

[4]) *A. Kossel* und *F. Kutscher,* Über die Bildung von Arginin aus Elastin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **25**. S. 551 (1898).

[5]) *C. Th. Mörner,* Untersuchung der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **18**. S. 61—106 (1894). — Vgl. auch über Kollagen.

wird. Nach Verlauf eines Tages wird die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und das Aufschlemmen so lange wiederholt, bis die Flüssigkeit kein Eiweiß mehr gelöst enthält. Das Kochsalz wird nun aus der Substanz durch gründliches Waschen mit destilliertem Wasser entfernt und die Substanz selbst auf einem Filter gesammelt. Sie kann ohne vorherige Alkohol- und Ätherbehandlung getrocknet werden.

b) Zwei Albumoide hat *Mörner* (loc. cit.) in den Grundsubstanzen der Linsenkapsel und der *Descemet*schen Haut nachgewiesen (tierische Membranine) und in folgender Weise dargestellt: Das rein präparierte Material wird mit 0·1%iger Kalilauge, welche in einem Zwischenraum von 1—2 Tagen erneuert werden muß, extrahiert, bis die Extraktionsflüssigkeit keine Eiweißreaktion mehr gibt und sodann das Alkali durch Auslaugen mit einer großen Menge destillierten Wassers zuerst bei Zimmertemperatur, dann bei 30—40° entfernt. Die Membran behält bei dieser Behandlung vollständig ihr ursprüngliches Aussehen bei; sie wird mit Alkohol und Äther ausgewaschen und im Exsikkator getrocknet.

c) Im Balkennetz des älteren Knorpels wies *Mörner*[1]) ein Albumoid nach, welches durch Tropäolin gefärbt wird. Man stellt es aus Trachealknorpel dar, indem man denselben mit 0·2—0·5%iger Kalilauge extrahiert, mit Wasser auswäscht und den Rückstand mit Wasser unter Druck zerkocht (bei 110—120°). Zusammen mit den Knorpelzellen hinterbleibt dabei das Albumoid als schwammige Masse.

d) Ein Chondro-Albumoid läßt sich (nach *Mörner*, loc. cit.) auch folgendermaßen darstellen: Man benutzt dazu das Septum nasale von Schweinen oder Ochsen. Die Knorpel werden von den anhaftenden Geweben befreit, in der Fleischmaschine zerkleinert und die Masse mehrmals zur Entfernung des löslichen Eiweißes mit 0·1—0·2%iger Salzsäure gewaschen. Danach wird die Salzsäure weggewaschen und die übrigen anhaftenden Substanzen, wie Chondromukoid, Nucleoprotein etc., durch anhaltende Extraktion mit 0·05—0·1%iger Kalilauge in Gegenwart von Toluol entfernt, bis keine säurefällbare Substanz mehr nachgewiesen werden kann. Sodann beseitigt man das Alkali durch Waschen mit Wasser in Gegenwart von Toluol, worauf der Rückstand der Behandlung mit kochendem Wasser und dem weiter unten beschriebenen Prozeß zur Darstellung des Osseoalbumoids unterworfen wird (*Hawk* und *Gies*, loc. cit.).

e) Zur Darstellung eines „Osseoalbumoids" verfährt man auch in folgender Weise: Man stellt sich Ossein dar (wie gelegentlich der Kollagengewinnung beschrieben), wobei man die Osseinspäne in 0·2%iger, häufig erneuerter Salzsäure aufbewahrt. Nachdem das Ossein, wie bereits angegeben, mukoidfrei gewaschen und mit häufig erneuerter 0·2%iger Salzsäure bis zur Entfernung der Mineralbestandteile (Phosphate) behandelt ist, wird die Salzsäure durch Waschen mit Wasser und durch Dialyse entfernt. Das voll-

---

[1]) *C. Th. Mörner, Malys* Jahresberichte. Bd. 18. — Derselbe, Skandinav. Archiv für Physiologie. I. S. 234 (1889).

kommen säurefreie Ossein wird sodann mit kochendem Wasser behandelt, bis das Kollagen größtenteils in Glutin übergeführt ist und nur ein geringer Anteil unlöslicher Substanz hinterbleibt. Das Wasser wird bei diesem Prozeß häufig erneuert und das Kochen mit Wasser so lange fortgesetzt, bis die Lösung mit Pikrinsäure oder Quecksilberjodidjodkali nur noch schwache Trübungen gibt. Die schließlich hinterbleibende flockige gelbweiße Masse wird nun zuerst mit 0·2%iger Salzsäure, dann mit Wasser, dann mit 0·5%iger Soda, wieder mit Wasser, schließlich mit Alkohol und Alkoholäther gewaschen. Endlich wird sie noch einmal im Soxhlet mit Äther extrahiert und getrocknet. Das Osseoalbumoid stellt ein leichtes, nicht hygroskopisches, gelbweißes Pulver dar (*Hawk* und *Gies*, loc. cit.).

f) Ichthylepidin nennt *Mörner*[1]) ein neben dem Kollagen in den Schuppen vieler Fische vorkommendes Albumoid. Die Darstellung desselben gelingt in folgender Weise: Nachdem die mit dem Messer losgemachten Schuppen von groben Verunreinigungen durch Aufschlemmen mit Wasser und durch Auslesen mit einer Pinzette von Beimengungen befreit worden sind, werden sie bei niederer Temperatur sukzessive mit 0·5%iger Salzsäure, 0·05%iger Kalilauge, 0·01%iger Essigsäure und destilliertem Wasser ausgelaugt — alles in großen Quantitäten — und jede der genannten Flüssigkeiten mehrere Tage hindurch unter häufigem Wechsel angewandt. Die auf diese Weise entkalkte Schuppenmasse wird während einiger Tage mit 0·1%iger täglich gewechselter Salzsäure und schließlich mit Chloroformwasser digeriert, bis die Flüssigkeit bei der Färbung mit Lackmus keine Säurereaktion mehr anzeigt. Der säurefreie Rückstand wird nun mit Alkohol und Äther gewaschen und im Exsikkator getrocknet. *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*[2]) hydrolysierten das Ichthylepidin.

g) Keratinoid. *Hedenius*[3]) stellte aus der Hornschicht des Muskelmagens der Hühner ein Keratinoid dar, indem er diese Schicht durch sehr verdünntes Ammoniak, essigsäurehaltiges Wasser, destilliertes Wasser, Alkohol und Äther erschöpfte. Die Substanz kann, ohne zerstört zu werden, zu weiterer Reinigung auch noch der Wirkung von Verdauungsfermenten ausgesetzt werden.

h) Keratoelastin. Die Eihüllen einiger monotremer Säugetiere sowie diejenigen verschiedener Reptilien und Fische, nehmen eine Zwischenstellung zwischen dem Elastin und den Keratinen ein. Die Reingewinnung dieser Substanzen ist einfach. Zum Zwecke neuerer Untersuchungen haben

[1]) *C. Th. Mörner*, Die organische Grundsubstanz der Fischschuppen vom chemischen Gesichtspunkt aus betrachtet. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 24. S. 125 (1898). — Vgl. auch: *E. H. Green* und *R. W. Tower*, Ichthylepidin in den Schuppen amerikanischer Fische. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 35. S. 196 (1907).

[2]) *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung der Proteine. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 52. S. 368 (1907).

[3]) *Hedenius*, Skandinav. Archiv f. Physiologie. Bd. 3. S. 244 (1891). — Vgl. dazu: *K. B. Hofmann* und *F. Pregl*, Über Koilin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 52. S. 448 (1907).

Pregl und *Buchtala*[1]) die Eihäute von Scyllium stellare. Pristiurus melanostomis und Scyllium canicula zuerst in 1%iger Salzsäure mehrere Tage quellen lassen, nach erfolgter Quellung abgespült, aufgeschlemmt und vom zurückgebliebenen gallertartigen Inhalt mechanisch unter dem Wasserstrahl befreit. Nachdem die Eihäute an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit Alkohol, sodann mit Äther und schließlich an der Luft völlig getrocknet.

Pregl (loc. cit.) hydrolysierte die Eihäute von Scyllium stellare.

Die Zusammensetzung der Eihäute von Testudo graeca ist von *Abderhalden* und *Strauß*[2]) untersucht worden.

IV. Das Ovokeratin,

die Hornsubstanz der Schalenhaut der Vogeleier, wird, wie folgt, dargestellt (*Abderhalden*[3]), *Lindwall*[4]), *Strauß*, loc. cit.): Die Eierschalen werden mechanisch zerkleinert und hierauf in Wasser mehrere Stunden mit einem großen Rührer in beständiger Bewegung gehalten. Hierbei bleiben die Schalenhäute zum großen Teil am Rührer hängen, während die Schalenstücke sich am Boden des Gefäßes absetzen. Die von den anhaftenden Schalenteilen so weit als möglich gereinigten Häute werden mit 5%iger Salzsäurelösung zwei Tage stehen gelassen, dann mit 5%iger Essigsäure auf dem Wasserbade gekocht und dann so lange mit Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat keine Säurereaktion mehr gibt. Durch Waschen mit Alkohol und Äther erhält man die Substanz schließlich trocken. Die Blättchen lassen sich zu einem feinen gelblichen Pulver zerreiben.

V. Das Neurokeratin,

ist die von *Kühne* und *Ewald*[5]) entdeckte, von *Kühne* und *Chittenden*[6]) weiter untersuchte, in den markhaltigen Nerven und in den nervösen Zentralorganen vorkommende Substanz, welche in Alkohol und Äther, in Magen- und Pankreassaft und in verdünntem Ätzkali unlöslich ist. *Argiris*[7])

---

[1]) *F. Pregl*, Über die Eihäute von Scyllium stellare Guenth. und ihre Abbauprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **56**. S. 1—10 (1908). — *H. Buchtala*, Elementaranalyse der Eihäute von Scyllium stellare, Pristiurus melanostomis und Scyllium canicula und Verteilung des Stickstoffes in denselben. Ibid. S. 11—17.

[2]) *E. Abderhalden* und *E. Strauß*, Die Monaminosäuren des Keratins aus Eiern von Testudo graeca. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 525 (1906).

[3]) *E. Abderhalden* und *E. Ebstein*, Die Monaminosäuren der Schalenhaut des Hühnereies. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 530 (1906).

[4]) *V. Lindwall*, Beitrag zur Kenntnis des Keratins. Laekaref. foerh. 16. Upsala. — *Malys* Jahresberichte. Bd. **11**. S. 38 (1881).

[5]) *Kühne* und *Ewald*, Verhandlungen des Naturw.-medizin. Vereins. Heidelberg 1877. Neue Folge. I. S. 357.

[6]) *Kühne* und *Chittenden*, Zeitschr. f. Biologie. Bd. **21**. S. 291 (1899). Vgl. auch Bd. **26** und *Neumeister*, ibid. Bd. **31**.

[7]) *A. Argiris*, Zur Kenntnis des Neurokeratins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **54**. S. 86 (1907).

(vgl. auch *Steel* und *Gies*[1]) verfuhr zu seiner Darstellung aus Gehirn in folgender Weise: Das Gehirn (Schale) wird nach Beseitigung der Häute und des anhaftenden Blutes durch die Fleischmaschine zerkleinert, mit Aceton 3—4mal behandelt und durch ein feines Haarsieb gerieben. Der Brei wird durch wiederholtes Schütteln mit neuen Äthermengen erschöpft, mit 75%igem Alkohol bei 40° so oft behandelt, bis das Filtrat beim Eindampfen keinen nennenswerten Rückstand hinterläßt und schließlich mit einer Mischung gleicher Teile Benzol und Alkohol am Rückflußkühler ausgekocht. Die abfiltrierten Massen werden in Wasser suspendiert, in flachen Schalen durch Erhitzen auf dem Dampfbad von Benzol befreit, darauf in großen Zylindergläsern mit Wasser und soviel Soda, daß der Gehalt etwa 0·5% beträgt, versetzt und nach Zufügen von Pankreatin zwei Wochen bei einer Temperatur von 39° gehalten. Die Verdauungsflüssigkeit wird mehrfach abgehebert und ersetzt. Das schließlich als Bodensatz verbleibende feine Pulver wird nach Beseitigung der alkalischen Reaktion durch vorsichtigen Zusatz von Salzsäure mit soviel Alkohol gemischt, daß der Prozentgehalt an Alkohol etwa 75% beträgt und am Rückflußkühler gekocht. Nach der Alkaliextraktion wird die Substanz mit Benzolalkohol in gleicher Weise extrahiert und nun abermals die tryptische Verdauung eingeleitet. Verdauung und Extraktion werden so lange alternierend wiederholt, bis die Verdauungsflüssigkeit keine Myelinsubstanzen mehr enthält. Der feine Brei wird nun mit 0·1%iger Salzsäure behandelt, mit Wasser säurefrei gewaschen und schließlich mit Alkohol und Äther durchgespült. Das Neurokeratin wird alsdann in der Reibschale fein zerrieben und durch ein engmaschiges Seidenfilter gesiebt. Es entsteht ein hellgelbes geruchloses Pulver.

VI. Die echten Keratine

sind die Grundsubstanzen der verhornten epithelialen Gewebe, und zwar diejenigen der Kutisgebilde. Da sie alle von ihrer Unterlage leicht zu isolieren sind, beschränkt sich ihre Darstellung meistens auf eine eingehende Reinigung durch Extraktion mit Wasser, Alkohol und Äther. Zur Isolierung der Hornhaut (Cuticula) ist es jedoch nötig, die Haut einer lang andauernden Pepsin- und Trypsinverdauung zu unterwerfen; hierbei hinterbleibt die eigentliche Hornschicht, welche dann mit Wasser gründlich gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet wird.

Nach *Gies* stellt man reines Keratin aus weißem Ochsenhorn in folgender Weise dar: Man schabt mit einem scharfen Stahlskalpell von reinem frischen Horn möglichst dünne Späne ab und zerkleinert dieselben sodann so weit als möglich in einer Pulvermühle. Das Material wird 24 Stunden lang mit wechselnden Mengen Alkohol und Äther zur Entfernung des Fettes extrahiert und dann zur Aufweichung der Partikelchen

[1]) *Steel* and *Gies*, On the chemical nature of paranucleoproteid, a new product from brain. American Journal of Physiol. Vol. **20**. p. 378 (1907).

einige Stunden mit Wasser von 40° C behandelt (kochendes Wasser ist zu vermeiden). Nun wird die Substanz einer längeren Einwirkung von Pepsinsalzsäure (0·2%ige Salzsäure) bei 38—40° und hierauf nach sorgfältiger Entfernung der Säure einer Einwirkung von stark aktivem Trypsinalkali (0·25%iges Soda) unterworfen. Die beiden Verdauungsprozesse müssen über eine Woche hindurch in Gegenwart von Toluol und mit mehrfach gewechselter Verdauungsflüssigkeit vorgenommen werden. Der Rückstand wird nun durch Waschen, dann durch Dialyse säurefrei gemacht und schließlich am Rückflußkühler mit einem Alkoholäthergemisch extrahiert. Nach Auswaschen mit warmem Äther wird das Produkt im Exsikkator getrocknet.

Über die Resultate der hydrolytischen Spaltung liegen für verschiedene Keratine Angaben vor.[1, 2, 3, 4, 5, 6])

---

[1]) *E. Fischer* und *Th. Dörpinghaus*, Hydrolyse des Horns. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 462 (1902).

[2]) *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*, Hydrolyse des Keratins aus Horn und Wolle. Ibid. Bd. **52**. S. 348 (1907).

[3]) *E. Abderhalden* und *E. R. Le Count*, Die Monoaminsäuren des Keratins aus Gänsefedern. Ibid. Bd. **46**. S. 40 (1905).

[4]) *E. Abderhalden* und *H. G. Wells*, Die Monoaminsäuren des Keratins aus Pferdehaaren. Ibid. Bd. **46**. S. 31 (1905).

[5]) *E. Abderhalden* und *D. Fuchs*, Der Gehalt verschiedener Keratinarten an Glutaminsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 339 (1908).

[6]) *H. Buchtala*, Über das Mengenverhältnis des Cystins in verschiedenen Hornsubstanzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **52**. S. 474 (1907).

γ) Histone und Protamine.

Von **H. Steudel**, Berlin.

I. Histone.

Prinzip der Darstellung der Histone.

Die zerkleinerten Organe werden mit stark verdünnter Salzsäure extrahiert und aus dem Filtrat wird durch Zusatz von Ammoniak oder Natronlauge (ev. unter Zuhilfenahme von Alkohol) ein Niederschlag von Histon erzeugt.

1. Histon aus Vogelblutkörperchen.

Isolierung der Kerne von Blutkörperchen aus Gänse- und Schlangenblut nach *Plósz.*[1])

Das defibrinierte Blut wird mit der zehnfachen Menge einer NaCl-Lösung von 3% zur Senkung der Blutkörperchen hingestellt: der durch Abgießen der Flüssigkeit erhaltene Brei der Blutkörperchen wird mit Äther und Wasser geschüttelt, wodurch die Kerne von den umhüllenden Zellteilen befreit werden und sich an der Berührungsfläche zwischen Äther und Wasser zusammenballen. Zur weiteren Reinigung von den Hüllen sowie von dem darin haftenden Blutfarbstoffe wird diese Prozedur mit neuen Äther- und Wassermengen einige Male wiederholt, hierauf die Masse mit verdünnter Salzsäure, heißem Alkohol und Äther gewaschen, wodurch die Kerne von den daran haftenden Zellresten vollständig befreit werden.

Oder: Die Blutkörperchen werden nach dem Behandeln mit Wasser und Äther in künstliche Verdauungsflüssigkeit gebracht und unter öfterem Erneuern 40—60 Stunden der Wirkung derselben ausgesetzt, dann mit verdünnter Salzsäure, Alkohol und Äther gewaschen.

Isolierung der Kerne von Butkörperchen aus Hühnerblut nach *Plenge.*[2])

Das unter Umrühren fibrinfrei gewonnene Blut wird möglichst frisch mit 0·9%iger NaCl-Lösung verdünnt und in einer 4 *l* fassenden Zentrifuge

---

[1]) *P. Plósz,* Über das chemische Verhalten der Kerne der Vogel- und Schlangenblutkörperchen. *Hoppe-Seylers* med.-chem. Untersuchung. S. 461. Berlin. Hirschwald (1866 71).

[2]) *D. Ackermann,* Zur Chemie der Vogelblutkerne. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 43. S. 300 (1904).

ausgeschleudert. Die abgesetzten Blutkörperchen werden noch einmal mit 0·9%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und zentrifugiert.

Die gewaschenen Blutkörperchen werden je nach der Menge in 1 oder 2 Scheidetrichtern von je 2 *l* Inhalt eingebracht und in jedem mit 1500 *cm*³ Wasser von 40° geschüttelt. Nach einiger Zeit werden zu je 1500 *cm*³ Wasser 500 *cm*³ NaCl-Lösung von 3·6% hinzugefügt. Dann wird zentrifugiert. Die abgesetzten Kernmassen werden von neuem in einem Scheidetrichter in 1500 *cm*³ Wasser von 40° unter Umschütteln suspendiert. Nach Hinzufügen von 500 *cm*³ NaCl-Lösung von 3·6% wird wiederum zentrifugiert.

Dies Vorgehen wird so oft wiederholt, bis die Masse ein farblos glasiges Aussehen ohne rote Streifen hat und an die Kochsalzlösung keinen Blutfarbstoff mehr abgibt. Dann wird die Kernmasse wiederum in Wasser zum Aufquellen gebracht und mit dem doppelten Volumen Alkohol zur Schrumpfung gebracht, zentrifugiert, in 96%igen Alkohol gebracht, abgesaugt, noch einmal mit 96%igem Alkohol verrieben und abgesaugt, dann in absolutem Alkohol und darauf in Äther getrocknet und abgesaugt.

Die ganzen Manipulationen dürfen bis zum Einbringen in Alkohol nicht mehr als 3 Tage in Anspruch nehmen. Es empfiehlt sich, die Kernmassen nachts über nicht mit Wasser allein, sondern nach Zufügung der NaCl-Lösung an einem kühlen Platze aufzubewahren.

Darstellung von Histon aus den Kernen von Vogelblutkörperchen nach *Kossel*.[1])

Die auf die eine oder andere Weise gewonnenen Kerne werden mit 0·8%iger Salzsäure extrahiert, filtriert und aus dem Filtrat das Histon durch Eintragen von Steinsalz ausgefällt. Der reichlich entstehende Niederschlag wird abfiltriert, mit salzhaltiger Säure ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und nun der Dialyse unterworfen. In dem Maße, wie das Salz durch Diffusion entfernt wird, geht die Substanz im Innern des Dialysators in Lösung. Aus der neutralen salzfreien Lösung wird das Histon durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak ausgefällt, abfiltriert und mit Alkohol und Äther getrocknet.

2. Histon aus der Thymusdrüse.

Darstellung nach *Kossel* und *Kutscher*.[2])

Das feinzerhackte Thymusgewebe wird mit etwa der doppelten Menge Wasser bei gewöhnlicher Temperatur ausgezogen und das wässerige Extrakt mit Salzsäure versetzt, bis der Gehalt an Salzsäure 0·8% beträgt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren und Filtrieren entfernt und das

---

[1]) *A. Kossel*, Über einen peptonartigen Bestandteil des Zellkerns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 8. S. 511 (1884).

[2]) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 188 (1900).

klare Filtrat mit Ammoniak gefällt. Das ausgefällte Histon wird mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen, in Alkohol gebracht und sodann mit Alkohol, zuletzt mit Äther völlig extrahiert.

Darstellung von Parahiston aus der Thymusdrüse nach *Fleroff*.[1])

Nimmt man statt der frischen Thymusdrüse das zerkleinerte, mit Alkohol und Äther erschöpfte Gewebe und extrahiert dieses 48 Stunden lang mit 2%iger Schwefelsäure, auf je 100 *g* 1000 *cm*³ H_2SO_4, so erhält man in dem Auszuge durch die dreifache Menge 96%igen Alkohols einen Niederschlag, der in heißem Wasser gelöst und mit Natriumpikrat ausgefällt wird. Das Pikrat wird mit Äther und 2%iger Schwefelsäure von der Pikrinsäure befreit und die Lösung mit Alkohol gefällt. Das durch wiederholtes Umfällen gereinigte Sulfat gibt, in heißem Wasser gelöst, mit überschüssigem Ammoniak einen Niederschlag (Histon), von dem abgetrennt wird. Aus dem Filtrat erhält man durch Fällung mit Alkohol das Parahiston, das nach einmaligem Umfällen und Filtrieren mit Alkohol und Äther getrocknet wird.

In gleicher Weise wie aus Vogelblutkörperchen läßt sich nach *Kossel* und *Kutscher*[2]) aus den reifen Spermatozoen von Gadus (Kabliau) ein Histon gewinnen — Gadushiston —, aus dem reifen Sperma von Lota vulgaris nach *Ehrström*[3]) ebenso das Lotahiston. Das unreife Sperma scheint häufig ein Histon zu enthalten (Scombron[4]), Lachsalbuminose.[5]) Das reife Sperma von Arbacia vulgaris (Seeigel) liefert ein Histon, das Arbacin.[6])

3. Darstellung des Globins.

Zu den Histonen gerechnet wird ferner von einigen Autoren unrichtigerweise das Globin, der Haupteiweißkörper des Hämoglobins (*Fr. N. Schulz*[7])). Das Globin gibt die Reaktionen der Histone nicht[8]) und unterscheidet sich von ihnen auch wesentlich durch seinen Hexonbasengehalt (siehe S. 446).

---

[1]) *A. Fleroff*, Über einen histonähnlichen Körper aus Thymus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **28**. S. 307 (1899).

[2]) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 188 (1900).

[3]) *R. Ehrström*, Über ein neues Histon aus Fischsperma. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **32**. S. 351 (1901).

[4]) *J. Bang*, Studien über Histon. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **27**. S. 463 (1899).

[5]) *Fr. Miescher*, Chemisch-physiologische Untersuchungen über die Lachsmilch. Archiv f. experim. Pathologie u. Pharmakologie. Bd. **37**. S. 151 (1896).

[6]) *A. Mathews*, Zur Chemie der Spermatozoen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **23**. S. 399 (1897).

[7]) *Fr. N. Schulz*, Der Eiweißkörper des Hämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **24**. S. 449 (1898).

[8]) *A. Kossel*, Über das Histon. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **49**. S. 314 (1906).

Setzt man zu einer Hämoglobinlösung eine sehr geringe Menge stark verdünnter Salzsäure, so entsteht eine flockige, braune Fällung, die sich im geringsten Überschuß von Säure sofort leicht löst. Die so erhaltene Lösung zeigt nicht mehr die schöne rote Farbe der ursprünglichen Hämoglobinlösung, sondern einen braunen Farbenton; jedoch wird dadurch nicht nur die Lösung in ihrer Farbe verändert, sondern es ist auch eine komplete Trennung zwischen Eiweißkörper und Farbstoff eingetreten. Setzt man nämlich zu einer solchen Lösung, die eben sauer reagiert, Alkohol (ca. $^1/_5$ Vol.) und schüttelt nunmehr mit Äther aus, so tritt der ganze Farbstoff in den Äther über, während die untenstehende, wässerig-alkoholische völlig klare Lösung den entfärbten Eiweißkörper enthält. Diese Spaltung und Trennung vollzieht sich mit ganz überraschender Leichtigkeit, wenn man einige Vorsichtsmaßregeln beobachtet. Zunächst muß die Hämoglobinlösung salzfrei oder doch sehr salzarm sein. Verwendet man eine salzreichere Lösung, so tritt, wenn man nicht außerordentlich vorsichtig verfährt oder mit verdünnten Lösungen arbeitet, auf Säurezusatz nicht eine vorübergehende, sondern eine bleibende, im Überschuß von Säure unlösliche Fällung auf. Diese bleibende Fällung erfolgt auch in salzfreien Lösungen, wenn man, nachdem der zuerst sich bildende Niederschlag durch einen sehr geringen Überschuß von Säure gelöst ist, nunmehr eine größere Menge von Säure hinzusetzt. — Ein stärkerer Salzgehalt wirkt auch beim Ausschütteln der durch vorsichtigen Säurezusatz erhaltenen Lösung mit Alkoholäther störend. Die Trennung des Farbstoffes vom Eiweißkörper vollzieht sich zwar auch hier glatt, aber der Eiweißkörper bleibt nicht in Lösung, sondern wird ausgefällt und nunmehr durch die Einwirkung des Alkohols leicht koaguliert.

In betreff des Ausschüttelns mit Äther ist zu bemerken, daß sich die Trennung des Äthers von dem wässerigen Alkohol leicht und sehr glatt vollzieht, wenn ein bestimmtes Verhältnis zwischen Wasser, Alkohol und Äther besteht, welches man am besten in jedem Versuche ausprobiert. Man setzt zunächst ca. $^1/_5$ Vol. 80%igen Alkohols zu der Hämoglobinlösung hinzu und versucht dann mit dem halben Volumen Äther auszuschütteln. Scheidet sich die Ätherschicht nicht sofort nach dem Schütteln glatt ab, so setzt man von neuem etwas Alkohol hinzu und versucht, ob sich nunmehr der Äther auch nach heftigem Schütteln sofort abscheidet. Ist dies nicht der Fall, so setzt man so lange vorsichtig Alkohol hinzu, bis eine rasche und glatte Abscheidung eintritt. Arbeitet man mit sehr konzentrierten Lösungen, so ist es zweckmäßig, wenn man kurze Zeit heftig geschüttelt hat, den Äther zu erneuern.

Man erhält so eine klare, mehr oder weniger braungelb gefärbte, wässerig-alkoholische, schwach saure Lösung. Aus dieser fällt beim Neutralisieren mit Ammoniak ein schwach gelb gefärbter, grobflockiger Niederschlag aus, der sofort abgesaugt wird. Dann wird er in Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure gelöst und durch mehrtägiges Dialysieren die Essigsäure entfernt; man erhält so eine völlig neutrale, absolut klare, schwach gefärbte Globinlösung.

Eigenschaften der Histone.

Sämtliche Histone sind stark basische Eiweißkörper, die ihrem Bau nach zwischen den einfachen Eiweißkörpern, den Protaminen und den komplizierten Eiweißkörpern stehen. Sie sind relativ stickstoffreich, 17 bis 20% N, und liefern bei der Hydrolyse verhältnismäßig reichliche Mengen von Hexonbasen:

	Histon aus Thymus[1])	Gadushiston[2])	Lotahiston[3])	Globin[4])	
Histidin	1·21	2·34	2·85	10·96	siehe dazu S. 444.
Arginin	14·36	15·52	12·00	5·42	
Lysin	7·7	8·30	3·17	4·28	

Ihre Basizität ist der Grund, daß sie, ähnlich wie die Protamine, schon aus neutraler Lösung durch die Alkaloidreagenzien (phosphorwolframsaures, phosphormolybdänsaures, pikrinsaures Natron, Ferrocyankalium) ausgefällt werden. Die meisten Histone sind fällbar durch Ammoniak, geben mit Salpetersäure einen Niederschlag, der in der Wärme verschwindet und beim Erkalten wieder erscheint, und gerinnen beim Erhitzen einer salzhaltigen, neutralen Lösung.

Mit den komplizierteren Eiweißstoffen geben sie in Wasser unlösliche Niederschläge. Durch Pepsinsalzsäure werden sie zerlegt unter Bildung eines als Histopepton bezeichneten albumoseartigen Produkts, das die basischen Eigenschaften der Histone ebenfalls besitzt (Fällung durch Natriumpikrat in neutraler Lösung).

Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Histon sind die Blutkörperchenkerne von Vogelblut, die Thymusdrüse und die reifen Spermatozoen einiger Fischarten (z. B. Gadus, Lota).

II. Protamine.

Prinzip der Darstellung.[5])

Die Spermatozoen werden aus den reifen Fischhoden isoliert und mit verdünnter Schwefelsäure extrahiert: aus dem Extrakt wird das Protamin-

[1]) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 191 (1900). — Vgl. auch *Emil Abderhalden* und *Peter Rona*, Die Abbauprodukte des „Thymushistons". Ebenda. Bd. **41**, S. 278 (1904).

[2]) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*, l. c. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 195 (1900).

[3]) *R. Ehrström*, Über ein neues Histon aus Fischsperma. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **32**. S. 351 (1901).

[4]) *E. Abderhalden*, Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **37**. S. 493 (1903).

[5]) *A. Kossel*, Über die basischen Stoffe des Zellkerns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 22. S. 178 (1896).

sulfat mit Alkohol ausgefällt und dieses weiter gereinigt (Ausscheidung als Öl, Fällung als Pikrat und Wiedergewinnung des Sulfats).

Die reifen Testikel werden zerhackt. Die zerhackte Masse wird mit Wasser anhaltend geschüttelt, durch ein Tuch geseiht und die milchige, kolierte Flüssigkeit mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt. Hierdurch bewirkt man, daß die im Wasser suspendierten morphotischen Elemente sich zusammenballen. Die Flüssigkeit wird filtriert, der Filterrückstand mehrmals mit Alkohol ausgekocht, sodann mit Äther extrahiert und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Je 100 *g* dieser Spermamasse werden mit 500 *cm*³ 1⁰/₀iger Schwefelsäure ¹/₄ Stunde lang auf der Schüttelmaschine ausgeschüttelt, auf der Nutsche abgesaugt und diese Extraktion noch dreimal mit der gleichen Menge Schwefelsäure wiederholt. Die vereinigten Filtrate werden mit der dreifachen Menge Alkohol gefällt, die Flüssigkeit nach 12 bis 24 Stunden dekantiert und der Niederschlag, welcher aus schwefelsaurem Protamin besteht, abgesaugt. Die Ausbeute an diesem Rohprodukt beträgt etwa 20⁰/₀ der trockenen Spermamasse. Zur weiteren Reinigung löst man den Niederschlag in heißem Wasser und wiederholt die Alkoholfällung. Wenn man jetzt den Niederschlag in etwa 1¹/₂ *l* heißen Wassers löst und im Scheidetrichter erkalten läßt, so scheidet sich ein kleiner Teil des Protaminsulfates als gelb gefärbtes Öl ab. Dieser am schwersten lösliche Teil des Sulfates wird abgetrennt, die über dem Öl stehende Flüssigkeit auf ein kleines Volumen eingedampft und im Scheidetrichter zur Ausscheidung der Hauptmenge des Öls stehen gelassen. Der nunmehr gewonnenen Fraktion des Protaminsulfats haftet hartnäckig etwas Nukleinsäure an. Um das Protamin hiervon zu befreien, wird es wieder in warmem Wasser gelöst, mit Natriumpikrat ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt, gut ausgewaschen und möglichst bald durch Ausschütteln mit Äther bei Gegenwart von Schwefelsäure von der Pikrinsäure wieder befreit. (Läßt man das Protaminpikrat längere Zeit stehen, so ist es schwer, die Pikrinsäure nachher völlig wieder zu entfernen und zum Schluß rein weiße Präparate zu bekommen.) Das nunmehr erhaltene Sulfat wird wieder mit Alkohol ausgefällt und die Alkoholfällung noch einmal wiederholt. Das Sulfat soll ein lockerer, weißer Niederschlag sein, fällt es klebrig aus, so muß das Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol wiederholt werden.

Nach dieser Methode können Salmin und Clupein in gleicher Weise gewonnen werden, bei der Darstellung von Sturin und Accipenserin muß die Lösung des Sulfats wegen der größeren Löslichkeit dieser Salze weiter eingedampft werden. Die Lösung des Cyclopterinsulfats[1]) muß bis auf 2⁰ abgekühlt werden, damit sich alles Protaminsulfat als Öl abscheidet.

---

[1]) *N. Morkowin*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Protamine. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 28. S. 313 (1899).

Eigenschaften der Protamine.

Die Protamine sind stark basische, stickstoffreiche (25—30%) Eiweißkörper, die bei mäßiger Hydrolyse Protone[1]) und bei vollständiger Spaltung in großer Menge Arginin liefern, daneben in weit geringerer Quantität Histidin, Lysin und einige wenige Monoaminosäuren, Prolin, Alanin, Aminovaleriansäuren. Das Cyclopterin enthält auch Tyrosin. Die Protamine geben in neutraler Lösung mit den Alkaloidreagenzien Niederschläge und bilden in ammoniakalischer Lösung mit den komplizierteren Eiweißkörpern etc. unlösliche Verbindungen.

Sie sind optisch aktiv: Salminsulfat: $\alpha_D = -80 \cdot 8$
Clupeinsulfat: $\alpha_D = -85 \cdot 49$ [2])
Skombrinsulfat: $\alpha_D = -71 \cdot 81$ [2]).

Ausgangsmaterial: Die reifen Testikel von Lachs, Hering, Stör, Makrele usw.

[1]) *M. Goto,* Über die Protamine. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **37**. S. 106 (1902). *A. Kossel* und *H. Pringle,* Beitrag zur Kenntnis der Protone. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **49**. S. 311 (1906).

[2]) *D. Kurajeff,* Über das Protamin aus den Spermatozoen der Makrele. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **26**. S. 528 (1898).

δ) Nukleoproteide.

Von **Franz Samuely,** Freiburg.

Man bezeichnet mit dem Sammelnamen „Nukleoproteide" solche Eiweißkörper, die sich aus einer Proteinkomponente und einem nicht proteinartigen Anteil zusammensetzen. Der letztere ist dadurch ausgezeichnet, daß an seinem Aufbau Purinkörper, Pyrimidinbasen, Phosphor in Gestalt von Phosphorsäure und ein der Pentosengruppe angehörendes Kohlehydrat beteiligt sind. Man bezeichnet diesen in seiner Konstitution erst zum Teil aufgeklärten Körper wegen seiner sauren Eigenschaften und seiner Provenienz als Nukleinsäure, deren es eine ganze Reihe verschieden zusammengesetzter Arten gibt.

Die eiweißartige Komponente, die mit der Nukleinsäure in mehr oder weniger fester Verbindung steht, ist nur für eine beschränkte Anzahl dieser Substanzen aufgeklärt. Man fand als solchen Proteinanteil ein durch ganz spezifische Reaktionen ausgezeichnetes Protein, das Histon, weshalb man eine besondere Gruppe als Nukleohistone abgetrennt hat. Dieselben finden ihre Besprechung zusammen mit den Histonen (vgl. S. 442 ff.). Alle übrigen Körper dieser Gruppe tragen schlechtweg den Namen eines Nukleoproteids. Ob die Eiweißkomponente allemal eine gleichartige ist, ist sehr zweifelhaft. Auch die Mengen der in einem solchen Proteid vorkommenden Eiweißkörper variieren erheblich, so daß die Eigenschaften und die Zusammensetzung erhebliche Unterschiede zeigen. Man bezeichnet daher jedes Nukleoproteid vorläufig nach dem Organ, aus dem es dargestellt wird.

Die Nukleoproteide, die wir mit unseren Methoden darstellen, sind keine nativen Nukleoproteide, d. h. sie erleiden durch die Art der Isolierung zumeist eine sekundäre Veränderung.

Man unterscheidet: α-Nukleoproteide. Sie werden bei Anwendung kalter, indifferenter Extraktions- und Lösungsmittel gewonnen.

β-Nukleoproteide, von wesentlich anderer Zusammensetzung als die α-Körper. Sie werden bei Verwendung heißer Lösungsmittel isoliert. Sie entstehen aus den α-Proteiden dadurch, daß diese in der Hitze in einen auskoagulierenden Eiweißkörper und das lösliche β-Proteid zerfallen.

In der Regel begnügt man sich mit der Gewinnung der β-Proteide.

Unter dem Einfluß gelinder Hydrolyse mit Hilfe von proteolytischen Fermenten (Pepsin) werden die Nukleoproteide gespalten. Es entstehen bei der Pepsinverdauung intermediär sogenannte Nukleine, welche immer noch Verbindungen von Eiweiß mit Nukleinsäure darstellen, also noch Purinbasen und Phosphor enthalten, und die Purinbasen erst bei weiterer, tieferer Spaltung (Trypsin oder Säuren) frei werden lassen. Die Nukleine kommen im Organismus nicht vor (Besprechung siehe S. 460).

Die Darstellungsmethoden beruhen im Prinzip alle auf den Eigenschaften der Nukleoproteide, in verdünnten Alkalien als Alkaliverbindungen oder in stark verdünnten Neutralsalzlösungen löslich zu sein und nach Zusatz einer verdünnten organischen Säure als wasserunlöslich auszufallen. Die Mehrzahl dieser Proteide ist auch im Überschuß von Essigsäure unlöslich. Eine andere weniger zweckmäßige Darstellung beruht auf der Aussalzung mit Neutralsalzen (Ammonsulfat).

Wir geben die Isolierungsmethoden einiger Nukleoproteide zunächst ausführlich wieder:

Nukleoproteid des Pankreas.

I. β-Nukleoproteid aus Pankreasgewebe nach *Hammarsten*[1]).

Frisches Pankreasgewebe vom Rind wird möglichst rein präpariert, zerschnitten und fein zerhackt. Es wird alsdann rasch mit Wasser aufgekocht und heiß filtriert. Es entsteht ein blaßgelbes Filtrat. Nach dem Erkalten säuert man mit Salzsäure oder Essigsäure an, so daß die Lösung 1—2‰ HCl oder 5—10‰ Essigsäure enthält. Es entsteht sofort ein reichlicher Niederschlag, der sich weiß und flockig zu Boden setzt. Er wird abzentrifugiert oder abfiltriert. Der Filterrückstand wird in möglichst wenig Alkali gelöst. Statt stark verdünnter Natronlauge kann man Ammoniak verwenden und gelangt so sofort zu farblosen Lösungen. Die Lösung des Alkalinukleoproteids wird erneut mit Essigsäure gefällt. Lösung und Fällung werden 3—4mal wiederholt. Der gewonnene Niederschlag wird zuletzt auf dem Filter mit ganz schwach essigsaurem Wasser, dann mit Alkohol und Äther behandelt und schließlich im Vakuum getrocknet.

Der Körper zeigt die Zusammensetzung: C 43·62, H 5·45, N 17·39, S 0·72, P 4·48, Fe + %.

II. α-Nukleoproteid des Pankreas nach *Umber*[2]).

Die frische, zerkleinerte Pankreasdrüse wird kalt mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert. Das klare Filtrat wird, wie oben, mit Essigsäure ausgefällt, der entstehende Niederschlag wird häufig mit essigsaurem Wasser dekantiert. Zuletzt wird er in Wasser aufgeschwemmt, unter Zusatz von möglichst wenig Soda gelöst, schnell filtriert und durch Ansäuern gefällt.

[1]) *O. Hammarsten*, Zur Kenntnis der Nukleoproteide. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **19**. S. 19 (1894). — Vgl. ibidem, Bd. **35**. S. 111 (1902).

[2]) *F. Umber*, Das Nukleoproteid des Pankreas. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **40**. S. 464 (1900). — Über die fermentative Spaltung der Nukleoproteide etc. Ibidem. Bd. **43**. S. 282 (1901).

Die Umfällung wird wiederholt und schließlich, wie oben beschrieben, mit Alkohol und Äther entfettet und getrocknet. Es muß besonders bemerkt werden, daß alle diese Operationen bei niederer Temperatur auszuführen sind.

Der Körper zeigt im Mittel die Zusammensetzung: C 51·35, H 6·81, N 17·12, P 1·67, S 1·29, Fe 0·13%.

Durch Kochen dieses Proteids in Wasser entsteht ein Koagulat. Aus dem Filtrat kann in der sub I beschriebenen Weise ein neues Nukleoproteid isoliert werden von der Zusammensetzung: C 43·62, H 5·45, N 17·39, P 4·48, S 0·72%.

Der Körper ist mit dem direkt nach I dargestellten β-Proteid identisch.

Ein von *Gamgee* und *Jones* nach dieser Methode dargestelltes β-Nukleoproteid aus Schweinepankreas hatte die Zusammensetzung: C 45·83, H 6·26, P 5·05, N 17·42%.

III. Darstellung des α-Nukleoproteids nach *Gamgee* und *Jones*[1]).

Gut zerkleinertes, frisches Pankreasgewebe vom Schwein wird sukzessive mit 50-, 75-, 90- und 95%igem Alkohol und schließlich mit Äther extrahiert. Der trockene Rückstand wird in der Kälte entweder mit 20 Teilen Wasser oder mit einer 5%igen Ammoniumacetatlösung extrahiert. Im ersteren Fall wird das klare Filtrat tropfenweise mit Essigsäure bis zu einem Gesamtgehalt von 1% Säure versetzt. Der weiße, flockige Niederschlag wird abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und mit Ammoniak bis zu gegen Lackmus neutraler Reaktion versetzt. Der Niederschlag geht schon vor Erreichung des Neutralpunktes in Lösung. Alsdann wird filtriert, mit sehr geringen Mengen Essigsäure erneut gefällt und diese Reinigung durch Lösen und Fällen mehrfach wiederholt.

Die zuletzt entstehende Lösung des Ammonsalzes wird in die 5fache Menge 95%igen Alkohols gegossen.

Hat man Ammoniumacetatlösung zur Extraktion benutzt, so werden die klar filtrierten Extrakte sofort mit dem 4—5fachen Volum 80%igen Alkohols versetzt.

Die in beiden Fällen durch Alkohol erzeugten Niederschläge werden mit großen Mengen 95%igen Alkohols dekantiert, schließlich auf dem Filter mit Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Eine Methode zur Darstellung des β-Proteids nach *Levene* und *Stookey* bietet keine praktischen Vorzüge. Sie extrahieren mit 5%iger kochender Natriumkarbonatlösung, verfahren sonst in der beschriebenen Weise.

Eigenschaften der Pankreasnukleoproteide:

α-Proteid: $(\alpha)_D = + 38·1^0$ $(37·5^0)$ in einer Spur NH_3 gelöst.

Bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure oder Trypsin entstehen Albumosen, Peptone neben Guanylsäure. Ein durch kurzdauernde Pepsinwirkung abgespaltenes Nuklein enthält 5·2% Proteid. Das Proteid ist also nicht absolut fermentresistent unter Abspaltung eines resistenten Nukleins (*Milroy*[2]).

[1]) *A. Gamgee* und *W. Jones*, Über die Nukleoproteide des Pankreas, der Thymus und der Nebenniere, mit besonderer Berücksichtigung ihrer optischen Aktivität. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 4. S. 10 (1904).

[2]) *Th. Milroy*, Über die Eiweißverbindung der Nukleinsäuren und Thymussäuren usw. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22. S. 307 (1897).

Darstellung des Nukleins siehe S. 460.

Als Produkte der Säurehydrolyse wurden Guanin, eine Pentose, Phosphorsäure und Aminosäuren aufgefunden.

β-Proteid $(\alpha)_D = + 64\cdot4^0$. Die Spaltprodukte sind die gleichen, wie diejenigen des α-Proteids.

Nukleoproteid der Leber.

Darstellung nach *Wohlgemuth.*[1])

$2^1/_2$—3 *kg* frische Rinderleber werden zu Brei zerdrückt und mit 5—6 *l* Wasser 10 Minuten lang im Blechtopf gekocht. Hierauf wird die Flüssigkeit abfiltriert und die Leber 2—3mal dieser Prozedur unterworfen. Nach dem Abkochen werden die Filtrate mit verdünnter Essigsäure so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Es bilden sich Flocken, die sich schnell zu Boden senken. Bleibt die Flockung aus, so kann sie durch Erwärmung angeregt werden.

Die Niederschläge werden auf einem Filter gesammelt, mit ganz schwach saurem Wasser gründlich gewaschen, auf Filtrierpapier abgepreßt und mit $96^0/_0$igem Alkohol zerrieben. Unter vorsichtigem Dekantieren wird der Alkohol oft gewechselt. Alsdann wird mit $99\cdot8^0/_0$igem Alkohol, unter mehrmaligem Wechseln desselben übergossen und mehrere Tage stehen gelassen, um die letzten Farbstoffe und Fettreste zu entfernen. Es folgt eine mehrtägige Ätherextraktion im Soxhletapparat.

Ausbeute: 1 *kg* Leber liefert 3—4 *g* Substanz.

Will man die Reinigung bis zur Konstanz des Phosphorgehaltes fortsetzen, so löst man den Körper kalt in sehr verdünnter Sodalösung, filtriert und fällt im Filtrat mit verdünnter Essigsäure. Diese Prozedur wird 2—3mal wiederholt. Das Präparat wird mit Alkohol und mit Äther gewaschen und bei 60^0 getrocknet. Der Körper zeigt die Zusammensetzung: C 45·22, H 5·72, N 16·67, P 3·06, S $0\cdot637^0/_0$.

Nukleoproteid aus Nebennieren.[2])

Frische Nebennieren werden gesammelt, von Fett befreit, in der Hackmaschine zerkleinert und mit $70^0/_0$igem Alkohol aufbewahrt. Hat man hinreichend Material, so filtriert man ab und extrahiert den Gewebebrei aufeinander folgend mit $95^0/_0$igem Alkohol, absolutem Alkohol und Äther. Danach trocknet man und pulverisiert die Gewebsmasse fein. Jede Erwärmung bei dieser Prozedur ist zu vermeiden. Die trockene Drüse läßt man für 1 Stunde mit $2^0/_0$igem Ammoniak in der Kälte stehen, dann filtriert man durch ein Koliertuch ab und extrahiert den Kolierrückstand in der gleichen Weise mit Wasser. Die vereinigten Extrakte, die nicht durch Filtration oder Zentrifugieren klärbar sind, werden in der Kälte tropfen-

[1]) *J. Wohlgemuth*, Über das Nukleoproteid der Leber. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37. S. 475 (1903). — II. Ibid. Bd. 42. S. 519 (1904).

[2]) *W. Jones* und *G. H. Whipple*, Das Nukleoproteid der Nebennierendrüse. Amer. Journ. of Phys. Vol. 7. p. 423 (1902).

weise bis zu eben saurer Reaktion mit verdünnter Essigsäure versetzt. Die nun stark sich bräunende Lösung läßt ein dunkles, spärliches Präzipitat ausfallen. Das Filtrat desselben wird in 95%igen Alkohol (4faches Volumen) gegossen. Es entsteht eine weiße Fällung, welche mehrfach mit 95%igem Alkohol dekantiert, dann mit absolutem Alkohol, zuletzt mit Äther gewaschen wird. Dieses Ammonsalz löst man in Wasser und fällt das freie Proteid mit Essigsäure. Das gefällte Proteid wird gut mit schwach essigsäurehaltigem Wasser gewaschen und in hohen Glaszylindern durch Dekantieren mit 95%igem und absolutem Alkohol und Äther gewaschen.

Die Ausbeute beträgt im Maximum 6·0 *g* aus 100 *g* trockener Drüsensubstanz. Das Proteid hat die Zusammensetzung: C 45·2—46·8, H 6·10—6·38, P 4·7—5·0, N 17·9—17·4%. Unter den basischen Hydrolysenprodukten wurden identifiziert: Guanin, Adenin, Thymin.

Da sich bei der Nebennierenautolyse auch Hypoxanthin und Epiguanin finden, so muß die Drüse noch ein oder mehrere andere Nukleoproteide enthalten.

Nukleoproteid der Milchdrüse (*Odenius*[1]).

Die Darstellungsmethode ist im wesentlichen jene von *Hammarsten* für das Nukleoproteid des Pankreas. Das fein zerhackte Gewebe eines Kuheuters wird mit Wasser ausgekocht. Das kalte, klare Filtrat des Extraktes wird mit verdünnter Essigsäure gefällt. Zur Reinigung wird mehrfach in möglichst wenig Alkali gelöst und mit Säure gefällt. Es folgt eine Extraktion mit Alkohol und mit Äther. Das Nukleoproteid ist relativ leicht zersetzlich, daher darf die erste Extraktion mit siedendem Wasser nicht allzu lange andauern.

Der Körper enthält im Mittel: 17·28% N, 0·89% S und 0·277% P und gibt bei der Säurehydrolyse eine Pentose und Guanin, aber keine anderen Nukleinbasen. Da aber durch *Mandel* und *Levene* und *Loebisch* aus der Milchdrüse eine Nukleinsäure isoliert worden ist, welche Guanin, Thymin und Cytosin enthält, so muß in diesem Organ noch ein Nukleoproteid enthalten sein, das bis jetzt nicht isoliert ist.

Nukleoproteid der Submaxillardrüse (*Holmgren*[2]). Der Extraktion des Proteids hat eine Entfernung des Drüsenmuzins voranzugehen. Die sehr fein zerschnittenen Drüsen werden gut mit Wasser ausgewaschen, hierauf gefroren und in diesem Zustand mit Sand innig verrieben. Zu dieser Masse wird Wasser hinzugesetzt und so oft nach Abzentrifugieren jeweils erneuert, bis die letzten Waschflüssigkeiten keine Trübung mehr mit Essigsäure geben. (Ob es gelingt, auf diesem Wege alle Muzinspuren zu beseitigen, scheint zweifelhaft.) Hierauf folgt eine Extraktion mit 0·05% Ammoniak während 24 Stunden. Mit Essigsäure wird das Proteid gefällt und durch mehrfaches Umfällen aus schwach NH_3-haltiger Lösung gereinigt.

---

[1]) *R. Odenius*, Einige Untersuchungen über ein Nukleoproteid der Milchdrüse. Upsal. läkaref. Förhandl. N. F. 5; *Malys* Jahresbericht. 1900. S. 39.

[2]) *E. Holmgren*, Über das Vorkommen eines sogenannten Muzinogens in der Speicheldrüse. Upsal. läkaref. Förhandl. N. F. 2; *Malys* Jahresbericht. 1897. S. 36.

Das Proteid enthält 15% N, 2·9% P, eine Kohlehydratgruppe und Purinbasen.

Das Nukleoproteid der Thyreoidea nach *Oswald* (siehe S. 401, Note 1).

Das Proteid wird der Schilddrüse zugleich mit dem Thyreoglobulin durch Extrahieren mit physiologischer Kochsalzlösung entzogen und findet sich nach dem Entfernen dieses Globulins in Lösung. Über die Methode dieser Trennung und Darstellung siehe bei Thyreoglobulin Seite 401.

Die Filtrate des durch Halbsättigen mit Ammonsulfat von Thyreoglobulin befreiten Extraktes werden durch Eintragen von Ammonsulfat in Substanz beinahe zur Ganzsättigung gebracht. Es scheidet sich ein Niederschlag ab. Derselbe wird abfiltriert, in Wasser gelöst und diese Lösung der Dialyse unterworfen. Im Dialysenschlauchinhalt bleibt eine Lösung, aus der das Proteid durch Zusatz von 95%igen Alkohol gefällt wird.

Die Methode von *Hammarsten* ist zur Darstellung dieses Nukleoproteids nicht geeignet.

Eigenschaften: Der Körper ist jodfrei; er enthält nur 0·16% Phosphor; er liefert mit Pepsinsalzsäure ein ungelöst bleibendes Nuklein; er enthält eine Kohlehydratgruppe, die nicht den Pentosen angehört, und ferner Nukleinbasen.

Nukleoproteid aus Magenschleimhaut und Magensaft (*Pekelharing*[1]), *Nencki* und *Sieber*[2]). Darstellung aus Schleimhaut (*Pekelharing*[1]).

Die Schleimhaut von 10 Schweinemagen (Fundusteil) wird zerhackt und mit 6 *l* 0·5%iger Salzsäure 5 Tage lang bei 37° digeriert. Die Flüssigkeit wird über einem mit Filtrierpapierschnitzeln bedeckten Konus oder einer Filterplatte unter vorsichtigem Saugen abfiltriert. Die völlig geklärte Verdauungsflüssigkeit wird in Pergamentschläuchen gegen strömendes Wasser 24 Stunden lang dialysiert. Es trübt sich nach dieser Zeit der Schlauchinhalt. Durch Zentrifugieren desselben wird eine Abscheidung gewonnen. Dieselbe wird eine Stunde lang mit 30—40 cm^3 einer 0·2%igen Salzsäure bei 30° digeriert und bei dieser Temperatur danach filtriert. Das klare Filtrat von gelblicher Farbe trübt sich beim Abkühlen. Es wird dann abermals 15—20 Stunden lang dialysiert und der Schlauchinhalt filtriert. Der Filterrückstand wird abermals unter den beschriebenen Bedingungen in 0·2% HCl gelöst und nun gegen destilliertes Wasser dialysiert; dann wird der entstandene, meist feinkörnige Niederschlag auf ein Filter gebracht, mit wenig destilliertem Wasser gewaschen, vom Filter entfernt und über Schwefelsäure getrocknet.

Aus der ursprünglichen, zur ersten Dialyse angesetzten Lösung dieses Körpers scheidet sich bei der ersten Dialyse nicht der gesamte Körper

[1]) *C. A. Pekelharing*, Über eine neue Bereitungsweise des Pepsins. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 22. S. 233 (1896).

[2]) *M. Nencki* und *N. Sieber*, Beiträge zur Kenntnis des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 32. S. 291 (1901).

ab. Der noch in Lösung befindliche, dem obigen identische Bestandteil wird folgendermaßen gewonnen:

Die Flüssigkeit wird zentrifugiert und mit NH_3 und basischem Bleiacetat versetzt. Der voluminöse Niederschlag, der entsteht, wird filtriert, vom Filter entfernt und mit einer gesättigten Oxalsäurelösung versetzt. Nach einigem Stehen scheidet sich vom Bleioxalat eine gelbbraune Flüssigkeit ab, welche abfiltriert wird. Die Menge derselben beträgt 200—400 *cm*³. (Die Menge des Dialysats beträgt 6—7 *l*.) Das stark saure Filtrat wird gegen Leitungswasser dialysiert. Der Niederschlag, der im Schlauchinhalt ausfällt, wird durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt, bei 37°, wie oben schon beschrieben, in 0·2% HCl gelöst, durch Dialyse gegen destilliertes Wasser erneut gefällt und in der schon beschriebenen Weise gewaschen und getrocknet.

Die trockene, bräunlich gefärbte Substanz ist pulverisierbar, aber leicht hygroskopisch.

Eigenschaften: Ausbeute 0·5 *g* aus 10 Magenschleimhäuten.

Der Körper enthält 10% Phosphor im Maximum. Der Phosphorgehalt schwankt mit der Reinheit, 0·6% im Minimum. Der Körper ist in Wasser und verdünnter NaCl-Lösung löslich. Beim schnellen Erhitzen in wässeriger Lösung zerfällt er in ein bei saurer Reaktion unlösliches Nukleoproteid (β-Proteid?), in eine in warmem Alkohol lösliche phosphorhaltige Substanz und in eine Albumose.

Das Nukleoproteid kann abfiltriert werden. Es wird auf dem Filter mit Wasser gewaschen bis zum Verschwinden der Biuretreaktion in der Waschflüssigkeit, dann mit 85%igem Alkohol bei 45° digeriert, bei dieser Temperatur filtriert und wiederholt mit warmem Alkohol gewaschen. Es folgt ein Nachbehandeln auf dem Filter mit kaltem absolutem Alkohol und mit Äther und Trocknen über $CaCl_2$ oder H_2SO_4.

Der Körper hat die Eigenschaften eines Nukleoproteids und enthält 0·31—0·33% Phosphor bei 0·46% Asche. Er spaltet ferner beim Säurekochen Nukleinbasen ab, die in der Kälte mit ammoniakalischer Silbernitratlösung fällbar sind. Ein Kohlehydratkomplex fehlt.

In welcher Beziehung dieses zweite Nukleoproteid zu dem oben beschriebenen Körper steht, ist nicht aufgeklärt.

Nukleoproteid aus Milz (nach *Levene* und *Mandel*[1]).

Die zerkleinerten Rindermilzen werden mit 0·25%iger Natriumbikarbonatlösung extrahiert. Die Filtrate dieser Extrakte werden mit Essigsäure angesäuert. Der entstehende Niederschlag wird auf dem Filter solange mit

[1]) *P. A. Levene* und *J. A. Mandel*, Die Kohlehydratgruppe des Milznukleoproteids. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 47. S. 151 (1906).

Wasser gewaschen, bis die Biuretreaktion im ablaufenden Waschwasser ausbleibt.

Anstatt der Extraktion mit Natriumbikarbonat kann das Gewebe auch mit kochendem Wasser behandelt werden. Die Reinigung kann in der oft beschriebenen Weise durch Umfällen mit verdünnter Essigsäure aus schwach alkalischer Lösung geschehen. Die Präparate werden durch Behandeln mit Äther und Alkohol nach Möglichkeit entfettet.

Das Proteid enthält 1·18—1·85% Phosphor.

Nukleoproteid aus Thymus und lymphatischen Organen.

Die Proteide dieser Herkunft sind sehr eingehend studiert worden. Ein zuerst von *Lilienfeld*[1]) in einfacher Weise darzustellendes Proteid erwies sich als ein Nukleohiston (vgl. S. 449). Erst *Huiscamp* und *Malengreau*[2]) und später einwandsfrei *Bang* wiesen nach, daß neben dem sogenannten Nukleohiston ein Nukleoproteid vorhanden ist, dessen Eiweißkomponente kein Histon darstellt. Die von den drei Autoren gewonnenen Präparate erwiesen sich, von kleinen Unreinheiten abgesehen, als identisch. Die Darstellungsmethode nach *Bang* führt wohl zu den reinsten Präparaten.

Methode nach *Bang*[3]). Frisches Thymusdrüsengewebe wird in der Fleischhackmaschine zerkleinert, alsdann mit 1½—2 Liter einer 0·9%igen Kochsalzlösung versetzt und damit 24—48 Stunden in der Kälte belassen. Bei heißer Jahreszeit wird zweckmäßig etwas Chloroform als Antiseptikum zugesetzt. Nach dieser Zeit filtriert man und gewinnt eine milchigweiße Flüssigkeit von deutlich amphoterer, fast mehr alkalischer Reaktion. Durch Zentrifugieren oder Filtrieren gelingt eine Klärung nicht. In dieser Lösung, in der Zusatz von Calciumchlorid keinen Niederschlag hervorruft, erzeugt man durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Essigsäure eine Fällung. Diese Fällung ist meist bei einem Gesamtgehalt von 1% Essigsäure oder 0·2% Salzsäure beendet. (Der Niederschlag ist im Säureüberschuß leicht löslich!)

Der gelblichweiße Niederschlag wird auf ein Filter gebracht und mehrmals mit Wasser ausgewaschen, zuletzt mit Alkohol und danach mit Äther übergossen und bei 100° getrocknet. Es resultiert ein feines, gelbweißes Pulver.

Der Körper hat die Zusammensetzung: C 49, H 6·35, N 16·51, P 1·22 bis 1·01, Asche 2·36%. Durch mehrmaliges Kochen mit Alkohol wird der P-Gehalt nicht verändert.

Darstellung nach *Huiscamp*.[4]) Man extrahiert die fein zerhackte frische Thymusdrüse (150—200 *g*) 12—24 Stunden lang mit 500—600 cm^3

[1]) *L. Lilienfeld*, Zur Chemie der Leukozyten. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **18**. S. 473 (1895).

[2]) *F. Malengreau*, Deux Nucléoalbumines et deux Histons dans le Thymus. La Cellule. T. **17**. p. 339. — Sur les Nucléines du Thymus. Ibid. T. **19**. p. 285.

[3]) *J. Bang*, Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe. I. Bd. **4**. S. 115 (1904). — Derselbe, Chemische Untersuchungen über lymphatische Organe. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **4**. S. 362 (1904).

[4]) *W. Huiscamp*, Über die Eiweißkörper der Thymusdrüse. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **32**. S. 145.

kaltem Wasser. Zu dem durch Kolieren und Zentrifugieren von Formbestandteilen befreiten Extrakt setzt man eine Lösung von $CaCl_2$ (1 *cm*³ einer 10%igen $CaCl_2$-Lösung auf 100 *cm*³ Lösung). Es entsteht ein reichlicher Niederschlag aus Nukleohiston. Von diesem wird abfiltriert. Das Filtrat enthält das gelöste Nukleoproteid, das durch Zusatz von Essigsäure oder Salzsäure ausgefällt und nach der wiederholt beschriebenen Weise durch Umfällen gereinigt wird.

Ein Teil dieses Körpers kann auch aus einer Lösung in ganz verdünntem Ammoniak mit $CaCl_2$ als Calciumnukleoproteid gefällt werden. Der Niederschlag wird filtriert, mit Alkohol frei von $CaCl_2$ gewaschen, mit Äther versetzt und getrocknet.

Das Nukleoproteid gibt eine starke Reaktion nach *Millon* und *Adamkiewicz.*

Der Körper hat die Zusammensetzung: C 50·09, H 7·18, N 16·11, P 0·97, Asche 3·11%.

Das Calciumnukleoproteid: C 49·93, H 7·09, N 15·85, P 0·94, S 1·23, Ca 1·33%.

Die Methode der Darstellung von *Malengreau*[1]) beruht auf Aussalzung des Proteids mit Ammonsulfat aus einer Lösung des Nukleoproteids in sehr verdünntem Alkali. Die Methode bietet für die Reindarstellung keine Vorzüge gegenüber den bereits genannten.

Eigenschaften des Nukleoproteids. Für das nach *Bang* dargestellte Proteid ergaben sich folgende Fällungsgrenzen gegen Ammonsulfat im Kochsalzextrakt der frischen Drüse: Bei einer Sättigung von 30% tritt eine wirkliche Fällung ein (bisweilen schon bei 20—25%iger Sättigung). Die Abscheidung einer ersten Fraktion ist mit 40% beendet; mit 46 bis 60% scheidet sich eine zweite, oberhalb 60—100% eine dritte Fraktion ab. Kochsalz und Magnesiumsulfat fällen bei Halbsättigung.

Mit Pepsinsalzsäure entsteht ein Nuklein, das Phosphor und Purinbasen enthält. Die Bildung eines Nukleins bleibt aber aus, wenn das Nukleoproteid vorher mit Salzsäure behandelt oder gelöst war.

Eine Pentosengruppe existiert in dem Proteid nicht. Unter den Nukleinbasen prävaliert das Adenin. Durch Behandeln mit Salzsäure oder Alkali erleidet das Nukleoproteid eine Spaltung. Es geht ein Albuminat in Lösung, zurück bleibt ein Nuklein.

Das in Salzsäure unlösliche Nuklein hat die Zusammensetzung: N 16·58%, P 2·49—2·69%. Wird das Nukleoproteid mit 0·04%iger Natronlauge extrahiert, so geht ein Teil desselben in Lösung. Wird diese Lösung filtriert und mit Essigsäure gefällt, so entsteht ein Niederschlag, der gereinigt und getrocknet 16·57% N und 2·10—2·38% P enthält. Es handelt sich hier wohl um das gleiche Nuklein, das bei der Salzsäurebehandlung ungelöst zurückbleibt.

Identifizierung und Unterscheidung des Proteids von Nukleohiston der Thymus. Nach *Bang* verfährt man so, daß man das mit Essig-

[1]) *F. Malengreau,* Deux Nucléoalbumines et deux Histons dans le Thymus. La Cellule. T. **17**. p. 339. — Sur les Nucléines du Thymus. Ibid. T. **19**. p. 285.

säure aus dem Kochsalzextrakt oder der schwach alkalischen Lösung gefällte Proteid mit kalter 0·3%iger Salzsäure behandelt. Man gewinnt so ein Salzwasserextrakt, das filtriert wird, und mit dem man die typischen Histonreaktionen ausführt (siehe bei Histone, S. 442 ff.). Entsteht beim Abstumpfen der Reaktion mit NH_3 schon vor wirklicher Alkaleszenz, d. h. bei schwach saurer oder amphoterer Reaktion eine Fällung, so handelt es sich um die Existenz eines Albuminats. Damit ist die Histonnatur der Proteidkomponente in dem ursprünglichen Proteid ausgeschlossen. Entsteht aber bei vorsichtigem NH_3-Zusatz ein Niederschlag bei eben deutlicher alkalischer Reaktion, so liegt ein Histon vor, das durch weitere Reaktionen leicht identifizierbar ist.

Nukleoproteide in lymphatischen Organen (*Bang*[1]).

Nach der für das Proteid der Thymus gültigen Methode gelingt auch der Nachweis, daß die Lymphdrüsen, das Knochenmark und die weißen Blutkörperchen ein Nukleoproteid neben oder ohne gleichzeitiges Nukleohiston enthalten.

Lymphdrüsen. Man stellt sich, wie bei der Thymus, in der Kälte ein Kochsalzextrakt (0·9% Na Cl) der fein zerkleinerten Drüsen her. Das Extrakt wird zentrifugiert und filtriert. Es stellt eine durchsichtige, braun gefärbte, amphoter reagierende Flüssigkeit dar, die wie das Thymusextrakt mit $CaCl_2$ keine Fällung gibt. Mit ganz verdünnter Essigsäure wird ein flockiger Niederschag gefällt, der, wie bereits beschrieben, gereinigt wird. Der Körper enthält 0·83% Phosphor.

Seine Identifizierung als Proteid geschieht durch Spalten mit 0·3%iger Salzsäure und Nachweis eines Albuminats in der filtrierten salzsauren Lösung mit Hilfe der Fällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung zu 20% oder durch Ausfällen beim Abstumpfen der sauren zu einer fast neutralen Reaktion.

In der Lymphdrüse beträgt die Menge des Proteids 1·06% der Drüsensubstanz.

Im Knochenmark läßt sich nach dieser Methode kein Nukleoproteid nachweisen.

Leukozyten des Blutes: Man zentrifugiert das Blut. Am Bodensatz setzen sich die Leukozyten über den Erythrozyten als eine Art Speckhaut ab, die mit dem Platinspatel abgeschabt wird. Man schwemmt die Masse in physiologischer Kochsalzlösung auf und zentrifugiert sofort wieder. Der Leukozytenniederschlag wird alsdann mit 0·9%iger Kochsalzlösung oder mit Wasser in der Kälte extrahiert. Es entsteht eine Lösung, in der Essigsäure eine Fällung erzeugt. Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und in 0·5%iger H Cl übertragen. Es entsteht ein klares Filtrat, in dem in der beschriebenen Weise durch Abstumpfen reichlich Eiweiß (kein Histon) ausfällt.

---

[1]) *I. Bang*, Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe. III. Mitteilung. *Hofmeisters* Beitr. Bd. 4. S. 362 (1904).

Nach einer Bestimmung der Albuminatmenge finden sich fast 80% der festen Stoffe der Leukozyten als Albuminat wieder.

Über ein zweites Nukleoproteid im sogenannten Plasmaniederschlag siehe bei Nukleoproteid des Blutserums, S. 370 f.

Aus einem Rundzellensarkom ließ sich in der gleichen Weise ein Wasserextrakt darstellen, in dem sich auf die beschriebene Weise mit Essigsäure ein Nukleoproteid niederschlagen ließ, nachdem ein nukleinsaures Histon durch vorangehenden Zusatz von $CaCl_2$ gefällt worden war. Das Proteid enthält 0·48% Phosphor.

Die Gesamtmenge betrug 2·65 *g* bei einem Tumor von 300 *g*.

Daß außer den bisher genannten Organen auch andere Organe Nukleoproteide enthalten, ergibt sich daraus, daß aus sehr vielen Geweben durch Hydrolyse oder Autolyse Purinbasen gewonnen werden können, die nur aus einer Nukleinsäure resp. aus einem bisher nicht isolierten Nukleoproteid herstammen können.

Identifizierung eines Proteins als Nukleoproteid.

Man überzeugt sich, daß ein in Alkalien löslicher, durch verdünnte organische Säuren fällbarer Körper vorliegt. Derselbe wird auf diese Weise der Ausfällung von anderen Proteinen getrennt oder nach Möglichkeit rein dargestellt. Da er seine Löslichkeitseigenschaften mit manchen Nukleoalbuminen oder Mukoiden teilt, so bestimmt man qualitativ die Gegenwart von Phosphor. Fällt dieser Nachweis positiv aus, so ist eine Muzinsubstanz auszuschließen. Von den „Nukleoalbuminen" unterscheidet nur die Anwesenheit von Purinbasen in der Hydrolysenflüssigkeit des fraglichen Körpers: Man zerkocht die Substanz mit 5%iger Schwefelsäure, neutralisiert hierauf mit Barythydrat und filtriert noch heiß vom Baryumsulfat ab. Das klare Filtrat versetzt man mit ammoniakalischer Silbernitratlösung. Eine Fällung kündet die Gegenwart von Purinbasen an.

Untersuchung der Spaltprodukte der Nukleoproteide.

Die durch tiefgreifende Hydrolyse entstehenden Spaltprodukte, wie die durch gelinde Hydrolyse abgespaltene Nukleinsäure finden ihre gesonderte Besprechung (vgl. Kapitel Nukleinsäuren).

Durch Fermenthydrolyse mit Pepsinsalzsäure entstehen Nukleine. Diese Substanzen sind in ihrer Zusammensetzung noch keineswegs aufgeklärt. Sie sind als Verbindungen von Nukleinsäure mit wenig Eiweiß aufzufassen und enthalten zumeist 4—7% Phosphor. Es sind relativ starke Säuren. Nach allem, was man über die Bedingungen ihres Entstehens weiß, sind sie keineswegs konstant zusammengesetzt. Ihre Natur hängt ebenso sehr von der Art des Nukleoproteids, wie von der Intensität der Fermentwirkung ab. Man weiß, daß manche Proteide mit Pepsinsalzsäure sogar gar kein unlösliches Nuklein oder ein relativ fermentlabiles Nuklein geben, wie das Pankreasproteid, und ebenso, daß die Trypsinspaltung,

vermutlich wegen anderer Angriffspunkte der Fermentwirkung im Proteidgefüge, gar kein unlösliches Nuklein entstehen läßt. Natürlich ist dies so aufzufassen, daß wir in diesem Fall die intermediären, nukleinartigen Komplexe bisher nicht isolieren können.

Als Beispiel für die Darstellung eines Nukleins mag das Folgende genügen:

Darstellung eines Nukleins direkt aus Zellen oder Geweben: Man versetzt Gewebsstücke mit stark und gut verdauendem künstlichem oder natürlichem Magensaft und läßt das Gemisch bei 37° im Brutschrank bis zum Verschwinden von koagulablem Eiweiß stehen. Es hinterbleibt dann ein Bodensatz, der aus Nukleinen und Albuminoiden besteht. Diesen Rückstand trennt man von der Flüssigkeit, wäscht ihn mit Wasser bis zum Verschwinden einer starken Biuretreaktion (die Nukleine sind nicht ganz unlöslich in Wasser, daher nicht zu lange waschen!). Den Rückstand laugt man alsdann mit stark verdünntem Ammoniak (0·05%) aus. Das Filtrat wird mit Salzsäure versetzt, wobei ein Niederschlag entsteht, der zur Befreiung von Eiweißresten abermals mit Magensaft verdaut wird. Der nunmehr verbleibende Rückstand wird auf dem Filter gut ausgewaschen und durch mehrfaches Lösen in wenig stark verdünnter Lauge und Fällen mit einer verdünnten Essigsäure gereinigt. Hierauf wird auf dem Filter mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen.

Besonders die Behandlung mit Alkohol und mit Äther hat im Soxhletapparat solange zu geschehen, bis die letzten Reste von Lipoiden, Lezithin und Organphosphatiden entfernt sind. Am besten geht man bei der Darstellung eines Nukleins von einem bereits dargestellten, gereinigten Nukleoproteid aus.

C. Einige Umwandlungsprodukte der Proteine.

Von **Franz Samuely**, Freiburg.

An die Schilderung der Methoden zur Darstellung von Proteinen und Proteiden der Tierwelt sei eine kurze Besprechung von Methoden angereiht, welche die Darstellung von Umwandlungsprodukten der Proteine ermöglichen. Diese Substanzen kommen in der Natur nicht vor. Sie haben alle noch einen chemischen Aufbau, welcher dem der Proteine im Prinzip entspricht, sie geben auch einige der bekannten Eiweißfarbenreaktionen.

Nitrierte Eiweißkörper.

Außer einigen nitrierten Albumosen bzw. Peptonen ist eine als Xanthoproteinsäure bezeichnete Substanz genauer studiert, welche durch Nitrieren von Kasein neben diesen Albumosen durch Eintritt einer Nitrogruppe in einen nicht genauer bekannten Komplex des Kaseins entsteht.

Darstellung nach *v. Fürth*[1]). Man trägt fein gepulvertes, entfettetes Kasein vorsichtig und portionenweise in das doppelte Gewicht einer reinen, konzentrierten Salpetersäure ein. Die Säure enthält zur Bindung etwa entstehender salpetriger Säure einige Gramm Harnstoff. Jede Erwärmung ist bei dieser Nitrierung zu vermeiden. Man gewinnt so eine klare, gelbliche Lösung, die man unter guter Kühlung in einem feinen Strahl in das mehrfache Volumen gut gekühlten Wassers fließen läßt. Es entsteht ein hellgelber Niederschlag, den man auf dem Filter sammelt und gut mit Wasser auswäscht. Hierauf löst man den Körper in Natronlauge, in der er sich mit rotbrauner Farbe löst, und fällt ihn durch Zusatz von Essigsäure. Dieses Lösen und Fällen wird mehrfach wiederholt; zuletzt befreit man durch Dialyse von Salzbeimischungen und trocknet nach Vorbehandlung mit Alkohol und Äther.

Addition von Aldehyden.

Aldehydeiweiße sind inkoagulable Proteine, die aus genuinen Eiweißkörpern durch Anlagerung eines Aldehyds entstehen. Die Eigenschaften dieser Substanzen sind erheblich verschieden von denen der Muttersubstanz.

---

[1]) *O. v. Fürth*, Einwirkungen von Salpetersäure auf Eiweißstoffe. Habilitationsschrift. Straßburg 1899.

Darstellung von Aldehydeiweißen nach *Schwarz*[1]). Man läßt eine Lösung eines gereinigten Eiweißes, zu der man wenige Tropfen einer 40%igen Formaldehydlösung oder irgend eines anderen Aldehyds zugesetzt hat, geraume Zeit stehen und fährt dann je nach Wunsch mit dem Aldehydzusatz so lange fort, bis die Lösung nach einiger Zeit ihren Aldehydgeruch beibehält. Dann läßt man 2 Monate stehen, fügt unter Umständen der Aldehydeiweißlösung noch einen kleinen Aldehydüberschuß zu und fällt nach der genannten Zeit das in Lösung befindliche, inkoagulable Aldehydeiweiß durch ein Gemisch gleicher Mengen Alkohol und Äther. Zur Analyse werden die Fällungen mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über $CaCl_2$ getrocknet. Erhitzen ist zu vermeiden, da sonst der Aldehyd wieder abgespalten wird.

Die Zusammensetzung dieser Substanzen hängt von der Dauer bzw. der Menge des zur Addition disponiblen Aldehyds ab. Die verschiedenen Proteine nehmen in gleichen Zeiten ungleiche Mengen Aldehyd auf und verhalten sich gegen homologe Aldehyde verschieden.

Halogensubstituierte Eiweißkörper.

Künstliche Jodeiweiße entstehen, wenn man Jod auf Eiweißkörper einwirken läßt. Die dabei entstehenden halogenhaltigen Körper sind keine unveränderten, nur durch das neu eingetretene Halogenradikal ausgezeichneten Körper, sondern es sind jodierte Bruchstücke des ursprünglichen Eiweißmoleküls, die während der Jodierung durch unvermeidliche hydrolytische oder oxydative Nebenreaktionen entstehen. Unsere Methoden zur Darstellung solcher künstlicher Halogeneiweiße sind im Verhältnis zu den komplizierten Prozessen, die sie vermitteln, primitiv. Nur diejenigen Methoden sind biochemisch von Interesse, welche sekundäre Spaltungsprozesse durch etwa gebildeten Jodwasserstoff oder Oxydationsprozesse anderer Art nach Möglichkeit vermeiden oder zurückdrängen.

Als Beispiel führen wir die von *Hofmeister*[2, 3]) und die von *Hopkins* und *Pincus*[4]) geübten Methoden an.

Als Jodzufuhr dient Jod neben Jodkalium oder neben Jodkalium und jodsaurem Kalium. Die Jodierung selbst kann man bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion vor sich gehen lassen, indem man zur Bindung des während des Jodierungsprozesses entstehenden Jodwasserstoffes dem Reaktionsgemisch von vornherein $MgCO_3$ oder Na_2CO_3 bis zu schwach alkalischer Reaktion zusetzt. Andrerseits muß man bei Verwendung von JK neben JKO_3 durch Zusatz einer geeigneten Menge Schwefelsäure für das Frei-

---

[1]) *L. Schwarz,* Über Verbindung der Eiweißkörper mit Aldehyden. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **31**. S. 460 (1900).

[2]) *F. Hofmeister,* Untersuchungen über Proteinstoffe. Über jodiertes Eieralbumin. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **24**. S. 159 (1898).

[3]) *D. Kurajeff,* Über Einführung von Jod in das kristallisierte Serum- und Eieralbumin. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **26**. S. 462 (1899).

[4]) *F. G. Hopkins* und *S. N. Pincus,* Zur Kenntnis der Einwirkung der Halogene auf Proteine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **31**. S. 1312 (1898).

werden des Jods Sorge tragen. Den Jodierungsprozeß selbst läßt man am besten bei Zimmertemperatur oder etwa bei 40° vor sich gehen und unter Umständen sich über mehrere Tage ausdehnen.

Es läßt sich nun für die Darstellung der Jodeiweiße keine einheitliche Vorschrift geben, da jede Variation einer der vier wichtigsten Faktoren: Reaktion, Temperatur, Zeitdauer und Jodzufuhr zu einem verschieden zusammengesetzten Produkt führt.

Wir geben daher ein Beispiel wieder, aus dem die Arbeitsmethode hervorgeht.

Ungefähr 5·0 *g* kristallisiertes Serumalbumin werden mit 2·0 JK, 1·0 J und 0·05 JKO_3 in 250 *cm*³ Wasser zusammengebracht. Unter häufigem Umschütteln bleibt die Mischung 3 Tage lang bei 40—50° stehen. Am zweiten Tag bildet sich ein brauner, voluminöser Niederschlag. (Die über demselben stehende Flüssigkeit ist je nach der Anwesenheit eines Jodüberschusses mehr oder weniger gelb gefärbt.) Der Niederschlag des gebildeten Jodproduktes wird abfiltriert und so lange eiweißfrei gewaschen, bis die ablaufenden Flüssigkeiten keine Trübungen nach $Am_2 SO_4$-Sättigung mehr geben. Alsdann reinigt man den Körper durch mehrfache Umfällung aus schwach ammoniakalischer Lösung mit verdünnter Essigsäure. Den zuletzt entstandenen Niederschlag sammelt man auf Seidenfilter, wäscht aufs neue mit Wasser, 95%igem Alkohol und Äther, bis die Waschflüssigkeiten keinerlei Reaktion auf Jod respektive Jodwasserstoffsäure mehr geben. Zur Analyse trocknet man bei 110°.

Nach dieser Vorschrift sind Jodpräparate leicht darstellbar. Durch Variation der Jodzufuhr und der Einwirkungszeit wird man zu jodreicheren und jodärmeren Präparaten gelangen. Im allgemeinen genügt der Zusatz von 1 *g* Jod auf 2 *g* Eiweiß, um eine maximale Jodaufnahme zu erzielen.

Im Falle einer Jodierung bei saurer Reaktion setzt man der Eiweißlösung Jodkalium, jodsaures Kalium und so viel Schwefelsäure hinzu, als die Reaktion nach der folgenden Formel verlangt:

$$10\,KJ + 2\,HJO_3 + 5\,H_2SO_4 = 6\,J_2 + 5\,K_2SO_4 + 6\,H_2O.$$

Das Ausfällen des gebildeten Jodproduktes erfolgt bei saurer Reaktion der Lösung meist früher als bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion.

Alle sonst angegebenen Jodierungsmethoden ergeben im Prinzip nichts Neues.

Methode nach *Hopkins* und *Pincus*[1]). Man läßt Jod auf eine 1%ige Eiweißlösung bei 40°, Chlor oder Brom bei Zimmertemperatur einwirken. Alsbald entstehen beim Steigern des Halogenzusatzes dicke Niederschläge, die auf dem Filter eiweiß- und halogenfrei gewaschen werden.

Diese Substanzen bestehen anscheinend aus mehreren Halogenproteinen. Zu ihrer Trennung löst man die Niederschläge noch vor dem Trocknen in einer 1%igen Sodalösung, und fällt durch verdünnte Essigsäure in

[1]) *F. G. Hopkins* und *S. N. Pincus*, Zur Kenntnis der Einwirkung der Halogene auf Proteine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **31**. S. 1312 (1898).

Form eines weißen, flockigen Niederschlages (Gruppe I). Derselbe wird auf dem Filter mit Wasser gewaschen (ein geringer Anteil ist in Wasser löslich), mit Alkohol entwässert und im Vakuum getrocknet.

Eine Gruppe II eines anders zusammengesetzten Proteins gewinnt man aus dem Rohprodukt des Halogeneiweißes, indem man das Rohprodukt noch feucht, aber doch genügend von Wasser befreit, sorgfältig mit Alkohol anreibt, mit genügendem Alkohol verdünnt und dann auf dem kochenden Wasserbad schnell zum Sieden erhitzt. Das gesamte Rohprodukt geht hierbei in Lösung. Man gebraucht für 6 *g* etwa 100 cm^3 Alkohol. Die alkoholischen Lösungen läßt man durch einen Heißwassertrichter in abgekühlten Äther fließen. Das ausfallende Produkt wird auf dem Filter mit Äther gewaschen und in vacuo getrocknet.

Aus Ovalbumin ließen sich Produkte darstellen mit folgendem Halogengehalt in Prozenten:

	Chlor	Brom	Jod
Gruppe I	1·89	3·92	6·28
Gruppe II	3·60	10·82	17·94

Methode nach *Blum* und *Vaubel*[1]). Man versetzt die Eiweißlösung mit Natriumbikarbonat im Überschuß und fügt festes oder in Jodkalium gelöstes Jod hinzu. Das Gemisch wird auf dem Wasserbad unter häufigem Umschütteln auf 50° erwärmt. Von Zeit zu Zeit setzt man neue Mengen Jod und Bikarbonat hinzu, und hält die Lösung 4—5 Stunden erwärmt. Die Hauptreaktion der Jodierung gibt sich durch eine Zersetzung des Bikarbonats, d. h. stärkere Kohlensäureentwicklung kund.

Nach beendeter Jodierung und Abkühlung versetzt man mit Natronlauge und fällt unmittelbar darauf mit Essigsäure. Der abfiltrierte Niederschlag wird gut gewaschen und durch Auskochen mit Wasser und Alkohol von J und Na J befreit. Der Körper wird hierauf mit Äther von Alkohol befreit und im Vakuum getrocknet.

Die Mengen verbrauchten Jods betragen für 100 *g* Eiereiweiß (nicht koaguliert) 70 *g* Jod.

Die Bromierung geschieht nach der gleichen Methode. Da Bikarbonat schon in der Kälte etwas von Brom zerlegt wird, so hält man das Reaktionsgemisch von Eiweißlösung und Bromwasser durch langsames Zutröpfeln von stark verdünnter Natronlauge unter gleichzeitigem Umrühren nahezu neutral. In gleicher Weise verfährt man bei der Chlorierung mit Chlorwasser. Die weitere Verarbeitung des halogenhaltigen Produktes ist dieselbe, wie die des Jodkörpers.

Chlorierungsversuche der Proteine mit Kaliumchlorat führen zu Körpern, die vorläufig kein großes Interesse beanspruchen.

Desaminoproteine.

Mit diesen Namen bezeichnet man Umwandlungsprodukte der genuinen oder bereits tiefer abgebauten Eiweißkörper, die durch Einwirkung von

[1]) *F. Blum* und *W. Vaubel*, Über Halogeneiweißderivate I. Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 56. S. 393 (1897). — Desgl. II. Ibid. Bd. 57. S. 365 (1898).

salpetriger Säure entstehen. Die älteren Darstellungsmethoden solcher Substanzen sind in letzter Zeit von *Skraup*[1]) ausgebaut und ergänzt worden.

Darstellung von Desamino-Kasein. 100 *g* Kasein werden mit 140 *cm*³ Eisessig unter starkem Schütteln übergossen, eine halbe Stunde auf dem Wasserbad erwärmt und dann mit dem doppelten Volumen kochenden Wassers versetzt. Unter Erwärmen und Schütteln geht dann das ganze Protein in Lösung. Zu der erkalteten Lösung läßt man langsam eine Lösung von 80 *g* $NaNO_2$ in 1000 *cm*³ Wasser zufließen. Während dieser Prozedur ist der Kolben vor Außenluft verschlossen und gleichzeitig geht ein Kohlensäurestrom durch das Reaktionsgemisch. Unter gleichzeitiger, oft beträchtlicher Gasentwicklung bildet sich durch das zutropfende Nitrit ein weißer Niederschlag, die überstehende Flüssigkeit färbt sich gelb. Nach Verbrauch der gesamten Nitritmenge läßt man 4 Stunden stehen und erwärmt dann bis zur Beendigung einer Gasentwicklung am Wasserbad. (Starkes Schäumen! Daher große Kolben verwenden, 10 Liter!) Beim Erwärmen dunkelt das Reaktionsgemisch, der Niederschlag wird körnig. Derselbe wird heiß auf Leinwandfilter übertragen und mit heißem und kaltem Wasser bis zur Neutralität des Filtrats gewaschen. Hierauf entwässert man mit Alkohol und entfettet mit Äther im Soxhletapparat.

Ausbeute: Aus 100 *g* Kasein, 70 *g* Desaminokasein.

Elementarzusammensetzung: C 50·94, H 6·85, N 15·09, S 0·69, P 0·44 bis 0·47%.

Für die Darstellung von Desaminoglutin und Desaminoglobulin müssen einige technische Modifikationen des Verfahrens berücksichtigt werden:

Für Glutin. 200 *g* Glutin versetzt man mit (1000 *cm*³) heißem Wasser, dann wird auf 2 *l* verdünnt. Zu der kalten Lösung gibt man 200 *g* $NaNO_2$ in 1000 *cm*³ Wasser und fügt allmählich zu dem Gesamtgemisch 140 *g* Eisessig. Es tritt lebhafte Gasentwicklung auf! Nach 12 Stunden Stehen erwärmt man noch 2 Stunden am Wasserbad, bis die Gasentwicklung beendet ist. Die klare Flüssigkeit wird vorsichtig mit 1 *kg* gepulvertem Ammonsulfat versetzt (starkes Schäumen, daher Vorsicht!), wobei sich ein gelbes Harz abscheidet. Die halbfeste Masse wird auf einem Leinwandfilter gesammelt, oberflächlich gewaschen und in 400 *cm*³ Wasser gelöst. Aus dieser Lösung fällt man durch Aussalzen mit 200 *g* $Am_2 SO_4$ in Substanz. Das Lösen in Wasser und Fällen mit Ammonsalz wird 4mal wiederholt. Die letzte Fällung wird abfiltriert, in 400 *cm*³ Wasser gelöst, mit Barytwasser von der Schwefelsäure, mit CO_2 vom überschüssigen Baryt des Baryumsulfatfiltrates befreit. Das so gewonnene Filtrat des Baryumkarbonates wird im Vakuum bei gelinder Wärme eingedunstet. Zuletzt versetzt man die heiße Lösung mit dem doppelten Volumen Alkohol. Eine beim schnellen Abkühlen der heißen

[1]) *Zd. H. Skraup* und *Ph. Hoernes*, Über Desaminokasein. Monatsh. f. Chem. Bd. 27. S. 631 (1906). — *Skraup*, Über Desaminoglutin. Ibid. Bd. 27. S. 653 (1906). — *Skraup* und *H. Lampel*, Über Desaminoglutin. II. Ibid. Bd. 28. S. 625 (1907). — *W. Traxl*, Über Desaminoglobulin. Bd. 28. S. 59 (1907).

Lösung entstehende harzige Fällung wird durch plötzliches Erhitzen und langsames Abkühlen in Lösung gebracht. Das Filtrat dunstet man zum Sirup ein und trocknet diesen im Vakuum zu einer pulverisierbaren Masse.

Für Globulin verwendet man auf 20 *g* Serumglobulin 600 *cm*³ Wasser. 20 *cm*³ Eisessig und 16 *g* $NaNO_2$, in 200 *cm*³ Wasser gelöst. Man verfährt in der für das Desaminokasein beschriebenen Weise. Das Desaminoglobulin fällt aus der Lösung aus. Es wird durch sehr energisches Waschen, Anreiben und Auskochen mit Wasser von Nitrosoverbindungen gereinigt.

Elementarzusammensetzung: C 52·71, H 7·01, N 15·83, S 1·15%.

Eiweißartige Oxydationsprodukte der Proteine. Peroxyprotsäuren, Desaminoprotsäuren, Kyroprotsäuren.

Durch Oxydation von genuinen Eiweißkörpern entstehen als Produkte einer energischen Spaltung und gleichzeitigen Oxydation neben Albumosen. Peptonen und organischen Säuren einige Substanzen, welche noch die Biuretreaktion geben, und wegen ihrer sauren Eigenschaften und der Art ihrer Entstehung als Oxyprotsäuren bzw. Peroxyprotsäuren bezeichnet werden.

Für die Methoden ihrer Darstellung sind heute die Angaben von *v. Fürth*[1]) maßgebend.

Darstellung: ½ *kg* gut entfettetes Kasein wird in einem großen Standgefäß mit 8 *l* Wasser und ½ *l* Natronlauge (s = 1·3) übergossen. Unter Umrühren wird im Laufe einiger Wochen feingepulvertes Kaliumpermanganat portionenweise dieser Mischung zugefügt. Im ganzen werden 2 *kg* verbraucht. Das Reaktionsgemisch, das in der Zwischenzeit gallertig wird, wird zuletzt flüssig. Durch energisches Abzentrifugieren von ausgeschiedenem Braunstein gewinnt man eine klare, gelbe Flüssigkeit. Die Braunsteinpräzipitate werden mit kaltem Wasser gut aufgerührt und ausgewaschen; die vereinigten Flüssigkeiten werden filtriert und nach Abstumpfen der Lösung mit Eisessig zu schwach alkalischer Lösung mit überschüssigem Bleiessig gefällt. Der massenhafte weiße Niederschlag (Bleiniederschlag I) wird durch Dekantieren von dem größeren Teil der überstehenden Flüssigkeit getrennt, dann auf Büchnerfiltern gesammelt und in der Presse scharf abgepreßt.

Den Bleiniederschlag I suspendiert man in Wasser und entbleit ihn in der Wärme mit Schwefelwasserstoff. Durch Filtration trennt man vom Bleisulfid. Dieses selbst wird durch energisches Waschen mit heißem Wasser (6—13maliges Aufschwemmen und erneutes Sättigen mit H_2S) von den letzten Spuren ihm anhaftender Peroxyprotsäure befreit. Aus den vereinigten Filtraten und Waschflüssigkeiten fällt man die Oxalsäure mit Ätzbaryt. Die Filtrate des oxalsauren Baryums werden mit CO_2 von überschüssigem Baryt befreit, die Filtrate des Baryumkarbonates schließlich mit einem Überschuß von Silbernitrat gefällt. Den Silbernieder-

[1]) *O. v. Fürth,* Beiträge zur Kenntnis des oxydativen Abbaues der Eiweißkörper. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 6. S. 296 (1905).

schlag sammelt man auf einem Filter, wäscht ihn gut aus, suspendiert ihn dann in Wasser und befreit ihn vom Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff. Das Filtrat des Schwefelsilbers wird dann im Vakuum bei 50° eingeengt und zuletzt im Vakuum über Schwefelsäure eingetrocknet (= Peroxyprotsäure A). Das Filtrat des Silbernitratniederschlages wird gleichfalls mit Schwefelwasserstoff entsilbert, durch einen Luftstrom von H_2S befreit und mit einer Lösung von Quecksilberacetat versetzt. Den mit Wasser ausgewaschenen Niederschlag suspendiert man in Wasser und zersetzt ihn mit H_2S. Das Filtrat des Quecksilbersulfids enthält die Peroxyprotsäure B.

Das Filtrat der oben als Bleiniederschlag I bezeichneten Fällung wird mit Quecksilberacetat gefällt (Quecksilberniederschlag II). Der entstehende Niederschlag wird wie die Fällung der vorgenannten Peroxyprotsäure B behandelt. Das Filtrat des HgS und PbS enthält die Peroxyprotsäure C. Aus dieser wässerigen Lösung fällt man die Säure wiederum mit Quecksilberacetat im Überschuß. Den voluminösen Niederschlag wäscht man auf dem Filter gut mit Wasser aus. Dann verteilt man ihn in Wasser und bringt ihn durch Zusatz von Salpetersäure zum größten Teil in Lösung. Die klar filtrierte Lösung versetzt man durch Zusatz von Natronlauge bis zum Neutralpunkt und gewinnt eine gelatinöse Fällung des Quecksilbersalzes der Peroxyprotsäure C. Den Niederschlag bringt man auf ein Filter, behandelt ihn mit Alkohol und Äther, so daß eine pulverisierbare Masse entsteht. Diese wäscht man nach kurzem Trocknen mit Wasser gründlich salzfrei, dann entwässert man mit Alkohol, zuletzt mit Äther und trocknet über Schwefelsäure im Vakuum.

Um das Verfahren dieser zahlreichen, zeitraubenden Fällungen abzukürzen, kann man auch so verfahren:

Das als Bleiniederschlag I bezeichnete Gemisch der Säure A und B wird in trockenem Zustand mit alkoholischer Salzsäure (10 Teile absoluter Alkohol + 1 Teil mit gasförmiger Salzsäure gesättigter Alkohol) 2 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht.

Die klare gelbe Lösung der Peroxyprotsäureester wird im Vakuum bei 30—40 *mm* Druck von Alkohol befreit. Der sirupöse Rückstand wird in Wasser übertragen und durch energisches Durchrühren und Durchkneten mit häufig gewechselten Portionen Wasser in eine teigige Masse verwandelt. Den äußerlich getrockneten Rückstand löst man in Chloroform. Die Chloroformlösung wird durch wasserfreies Kupfersulfat entwässert und mit dem 5fachen Volumen wasserfreien Äthers gefällt. Durch häufiges Wechseln des Äthers erhärtet die erst teigige Fällung und läßt sich nach Beseitigen des Äthers und Trocknen im Vakuum über Paraffin und Schwefelsäure in ein zerreibliches Pulver verwandeln.

(Ausbeute 34 *g* aus 2 *kg* feuchtem Bleiniederschlag I.)

Dieses Estergemenge verseift man durch 1—2stündiges Kochen mit starkem Ammoniak. Die Lösung der Säuren wird filtriert, mit Tierkohle entfärbt und eingedunstet. Den Rückstand löst man in Wasser

und befreit ihn nach dem Ansäuern mit Salpetersäure durch vorsichtigen Zusatz von $AgNO_3$ von Chloriden.

Das Filtrat des Chlorsilbers wird vorsichtig neutralisiert. Durch erneuten Zusatz von Silbernitrat fällt man das Silbersalz der Säure A. Aus der Silberfällung kann man die freie Säure in der oben beschriebenen Art isolieren. Zu Analysenzwecken reinigt man das Silbersalz selbst, indem man die Fällung auf dem Filter gut auswäscht und mehrfach aus seiner Lösung in verdünnter Salpetersäure durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak fällt. Jede Fällung wird jedesmal auf einem gehärteten Filter gesammelt, gewaschen und vor der erneuten Lösung in verdünnter Salpetersäure mit Wasser gut angerieben.

Der zuletzt gewonnene Niederschlag wird durch Verweilen unter absolutem Alkohol gehärtet und entwässert. Nach dem Verdrängen des Alkohols durch Äther wird das staubfein zerriebene Produkt mit viel Wasser salzfrei gewaschen, auf dem Saugfilter gesammelt und in der üblichen Weise mit Alkohol und Äther nachbehandelt. Schließlich wird im Vakuum getrocknet.

Die Peroxyprotsäuren werden durch Barytspaltung in Desaminoprotsäuren, Oxalsäure und basische Komponenten zerlegt.

Im Prinzip gestaltet sich die Darstellung der Desaminoprotsäuren folgendermaßen: Das Silbersalz der Peroxyprotsäure A, oder das Quecksilbersalz der Säure C, oder das Rohgemenge der Säure A + B wird 3 Stunden lang mit Ätzbaryt gekocht (20 *g* Silbersalz + 15 *g* $Ba(OH)_2$). Von dem ausgeschiedenen Silberoxyd und Baryumoxalat wird durch Filtration getrennt. Das alkalisch reagierende Filtrat wird mit einem Überschuß von Quecksilberacetat gefällt. Der voluminöse Niederschlag wird auf einem Saugfilter durch häufiges Verreiben mit Wasser barytfrei gewaschen und dann, in Wasser suspendiert, durch H_2S zersetzt. Das von H_2S befreite Filtrat des HgS wird abermals mit Barytwasser 6 Stunden lang gekocht. Die filtrierte Lösung wird von überschüssigem Baryt mit CO_2 befreit, etwas eingeengt und dann filtriert und abermals mit Quecksilberacetat gefällt. Das entstehende Quecksilbersalz der Desaminoprotsäure wird weiter wie das Hg-Salz der Peroxyprotsäure C (siehe oben) gereinigt. Ausbeute: 1·2 *g* Hg-Salz aus 20 *g* peroxyprotsaurem Silber A, 9·4 *g* Hg-Salz aus peroxyprotsaurem Quecksilber C.

Während die Peroxyprotsäuren einer weiteren Oxydation widerstehen, lassen sich die Desaminoprotsäuren zu Kyroprotsäuren weiter oxydieren.

Darstellung von Kyroprotsäuren. Man geht nicht von den isolierten Desaminoprotsäuren, sondern von den Peroxyprotsäuren selbst aus.

Man löst das Rohprodukt von Peroxyprotsäure A + B (gewonnen aus dem oben genannten „Bleiniederschlag I" durch Entbleien und Eintrocknen der Filtrate) in Wasser und kocht 2 Stunden lang mit der gleichen Menge Barythydrat. Hierauf fügt man zu der in Eis gekühlten Lösung portionenweise Calciumpermanganat (auf 200 *g* Säure kommen 200 *g* Barythydrat und 110 *g* Permanganat). Nach eingetretener Entfärbung fil-

triert man und fällt das oxalsaure und barytfreie, alkalisch reagierende Filtrat mit Quecksilberacetat (Kyroprotsäure A + B). Die Fällung wäscht man auf dem Saugfilter gut mit Wasser aus, zersetzt sie dann mit H_2S und fällt aus dem von H_2S befreiten Filtrat die Kyroprotsäure B durch einen Überschuß von neutralem Bleiacetat. Aus dem Filtrat dieses Niederschlages fällt man die Kyroprotsäure A wiederum durch Quecksilberacetat.

Beide Niederschläge behandelt man weiter in der wiederholt beschriebenen Weise durch energisches Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther und Trocknen bei 95°.

Elementarzusammensetzung der Metallsalze der Säuren:

	Prozente						
	C	H	N	S	O	Ag	Hg
Peroxyprotsäure A (Ag-Salz)	29·96	3·81	8·98	0·73	20·14	37·01	—
Peroxyprotsäure B (Hg-Salz)	20·07	2·24	4·26	0·49	19·81	—	53·13
Peroxyprotsäure C	23·57	2·87	7·40	0·52	17·17		48·47
Desaminoprotsäure A	21·92	3·08	4·84	—	18·39	—	51·77
Desaminoprotsäure C	19·69	2·47	4·43	0·36	16·63	—	56·42
Kyroprotsäure A	20·50	2·42	5·28	0·32	16·72	—	57·76 (inkonstant)
Kyroprotsäure B	22·91	2·69	2·81	—	20·81	—	50·78.

D. Abbau der Proteïne und Isolierung der Abbauprodukte.

Totale Hydrolyse vermittelst Säuren.

a) Allgemeine Technik und Isolierung der Monoaminosäuren.

Von **Emil Abderhalden**, Berlin.

Zur vollständigen Aufspaltung der Proteïne zu den einfachsten Bausteinen, den Aminosäuren, wird meistens entweder rauchende Salzsäure vom spez. Gew. 1·19 verwendet oder 25%ige Schwefelsäure. Letztere wird mit Vorteil dann benutzt, wenn es sich um eine direkte Isolierung von Aminosäuren handelt, wie z. B. bei der Bestimmung des Tyrosins. Wird zur Darstellung der Aminosäuren die unten beschriebene Estermethode angewendet, so wird die Hydrolyse mit rauchender Salzsäure bevorzugt. Es sei gleich erwähnt, daß selbstverständlich die Estermethode auch dann Verwendung finden kann, wenn zur Hydrolyse Schwefelsäure benutzt worden ist und ebenso kann nach der Aufspaltung der Proteïne mit rauchender Salzsäure eine direkte Bestimmung der Aminosäuren erfolgen. So läßt sich z. B. das Tyrosin ohne weiteres nach erfolgter Entfernung der Salzsäure zur Abscheidung bringen. Dieser Weg wird jedoch zu quantitativen Bestimmungen von Tyrosin kaum eingeschlagen, weil er sehr umständlich ist. Während die Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt sehr leicht und quantitativ gelingt, erfordert diejenige der Salzsäure mehrere Operationen. Am besten wird zunächst die Hauptmenge der Salzsäure durch Eindampfen der Hydrolysenflüssigkeit unter vermindertem Druck entfernt. Durch wiederholtes Aufnehmen des Destillationsrückstandes mit Wasser und erneutes Eindampfen läßt sich ein weiterer Teil der Salzsäure vertreiben. Schließlich wird der verbleibende Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, durch Kochen mit Tierkohle entfärbt und nunmehr nach Bestimmung des Chlorgehaltes mit der berechneten Menge Natronlauge versetzt. Bessere Resultate erzielt man bei Anwendung von viel Eiweiß und dementsprechend auch von viel Salzsäure, wenn ein weiterer Teil der noch vorhandenen Salz-

säure durch Schütteln der Lösung des erwähnten Destillationsrückstandes mit Kupferoxydul gebunden wird. Sobald die Lösung eine grünblaue Färbung annimmt, wird abfiltriert und der Rückstand so lange mit Wasser gewaschen, bis eine verdampfte Probe keinen organischen Rückstand mehr hinterläßt. Die vereinigten Filtrate werden nun mit Schwefelwasserstoff von gelöstem Kupfer befreit. Aus dem meist hellgelb gefärbten Filtrat vom Kupfersulfid wird der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft entfernt. Jetzt stellt man entweder titrimetrisch oder gravimetrisch den Chlorgehalt der Lösung fest und setzt entweder die berechnete Menge von Natron- oder Kalilauge zu oder aber man schüttelt die Lösung mit der berechneten Menge Silberkarbonat. Aus der von Salzsäure vollständig befreiten Lösung läßt sich das Tyrosin durch Einengen leicht abscheiden. Es ergibt sich ohne weiteres, daß diese Methode sehr umständlich ist, und aus diesem Grunde wird die Hydrolyse mit Salzsäure fast ausschließlich dann angewandt, wenn auf eine direkte Isolierung von Tyrosin und auch von Lysin, Arginin und Histidin verzichtet wird.

Die verschiedenartigen Proteïne lösen sich sehr verschieden leicht in rauchender Salzsäure und in 25%iger Schwefelsäure. Am besten wird zunächst die Säure abgemessen und dann in einen ausreichend großen Rundkolben eingefüllt. Im allgemeinen wird von der rauchenden Salzsäure das dreifache Gewicht der angewandten Eiweißmenge und von der Schwefelsäure das fünf- bis zehnfache Gewicht davon verwendet. Löst ein bestimmtes Proteïn sich sehr schwer in den genannten Säuren oder quillt es sehr stark auf, so wird man unter Umständen auch größere Säuremengen anwenden. Es wird nunmehr das Proteïn in die Säure eingetragen, und zwar unter beständigem Umschütteln. Geht es direkt in Lösung, so kann sofort das Kochen am Rückflußkühler angeschlossen werden. Sehr oft quillt jedoch das Proteïn nur auf. In diesem Falle wird es mit der Säure so lange auf dem Wasserbade erhitzt, bis vollständige Lösung eingetreten ist. Genügt das Erhitzen auf dem Wasserbade nicht, so wird im Ölbade weiter gekocht. Manche Eiweißkörper, z. B. manche Seidenarten, gehen selbst nach mehrstündigem Kochen im Ölbade nicht ganz in Lösung. In diesen Fällen ist es ratsam, größere Säuremengen zu wählen und das Kochen länger als sonst üblich auszudehnen. Verwendet man Schwefelsäure, so kommt man in solchen Fällen rascher zum Ziele, wenn das Proteïn zunächst bei gewöhnlicher Temperatur mit 70%iger Schwefelsäure übergossen wird. Es tritt dann bei wiederholtem Umschütteln bald Lösung ein. Nunmehr wird die Lösung mit soviel Wasser verdünnt, bis sie auf einen Gehalt von 25% an Schwefelsäure gebracht ist.

Beim Auflösen der Proteïne mit Säuren tritt stets eine mehr oder weniger starke Färbung der Lösung ein. Bald erhält man violettgefärbte Lösungen, bald mehr braungefärbte. Sobald die Lösung des Proteïns eine vollständige oder doch nahezu vollständige ist, beginnt man mit dem Erhitzen im Luftbade auf dem Baboblech. Bei Verwendung von rauchender Salzsäure genügt im allgemeinen ein Kochen während sechs Stunden

gerechnet vom Beginn des Kochens an —, wird dagegen 25%ige Schwefelsäure benutzt, so muß der ganze Prozeß auf ca. 16 Stunden ausgedehnt werden. Zur Prüfung, ob die Hydrolyse eine vollständige ist, besitzen wir keine bestimmten Anhaltspunkte. Man begnügt sich mit der Feststellung, daß die Hydrolysenflüssigkeit keine Biuretreaktion mehr gibt.

Die weitere Verarbeitung ist verschieden, je nach der Art der gewählten Säure und der Art der zu isolierenden Spaltprodukte.

An Stelle von Säuren können zur Hydrolyse auch Kali- resp. Natronlauge (20—33%ige Lösungen) oder eine heiß gesättigte Barytlösung angewendet werden. Die auf diesem Wege gewonnenen Spaltprodukte sind dieselben, wie bei Verwendung von Säuren[1], nur sind sie optisch inaktiv. Hat man Barytlösung zur Hydrolyse benutzt, so entfernt man den Baryt quantitativ mit Schwefelsäure. Komplizierter gestaltet sich die weitere Verarbeitung bei Anwendung von Alkalilauge. Man verwendet berechnete Mengen von Lauge und neutralisiert diese nach erfolgter Hydrolyse mit Salzsäure. Das Tyrosin läßt sich dann durch Einengen der Lösung abscheiden. Die weiteren Monoaminosäuren werden mit Hilfe der Estermethode gewonnen.

Endlich läßt sich die Hydrolyse mancher Proteine auch mit Hilfe von proteolytischen Fermenten und speziell durch Kombination von Pankreas- und Darmsaft herbeiführen. Die Verarbeitung auf die einzelnen Aminosäuren erfolgt auch hier am besten nach den unten beschriebenen Methoden. Bei vorsichtiger Durchführung und vor allen Dingen möglichster Fernhaltung von Wasser ist auch bei Verdauungsversuchen die Estermethode die vorteilhafteste.

Isolierung von Glykokoll, d-Alanin, d-Valin, l-Leucin, l-Prolin, l-Asparaginsäure, d-Glutaminsäure, l-Serin und l-Phenylalanin.

Alle diese Aminosäuren werden mit Hilfe der von *Emil Fischer*[2] ausgearbeiteten „Estermethode" isoliert. Zur Hydrolyse des Proteïns wird, wie schon erwähnt, am vorteilhaftesten rauchende Salzsäure verwendet. Die auf die oben geschilderte Art erhaltene Hydrolysenflüssigkeit wird zunächst abfiltriert, um sie von etwa gebildeten Huminsubstanzen zu befreien. Am besten wird hierzu eine Nutsche und als Filter engmaschiges Koliertuch benutzt. Der meist dunkelbraun bis schwarz gefärbte Rückstand wird so lange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft. Nunmehr werden die gesamten Filtrate in einem Destillationskolben unter vermindertem Druck eingedampft. Der Kolben muß so groß

[1] *Emil Abderhalden, F. Medigreceanu* und *L. Pincussohn,* Vergleichende Hydrolyse von Seide durch kochende rauchende Salzsäure, 25%ige Schwefelsäure, 25%ige Natronlauge und heiß gesättigte Barytlösung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **61**. S. 205 (1909).

[2] *Emil Fischer,* Über die Hydrolyse des Kaseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 151 (1901).

gewählt werden, daß er beim Einfüllen der dreifachen Menge des Gewichts des Rückstandes an Alkohol höchstens etwa zu zwei Drittel angefüllt wird. Ist das zur Untersuchung vorliegende Proteïn reich an Glutaminsäure, so kann sie direkt als salzsaures Salz abgeschieden werden. In diesem Falle wird das Hydrolysat nicht sofort zur Trockne verdampft, sondern nur eingeengt und die Lösung unter Kühlung mit Eis aufbewahrt. Das ausgeschiedene Glutaminsäurechlorhydrat wird auf Koliertuch abgenutscht und mit Salzsäure gewaschen. Durch weiteres Einengen der Mutterlauge der ersten Kristallisation lassen sich noch weitere Mengen erhalten. Schließlich wird die Mutterlauge der letzten Abscheidung unter vermindertem Druck verdampft, nachdem man die Mutterlauge des umkristallisierten, rohen Glutaminsäurechlorhydrates noch hinzugefügt hat. Beim Eindampfen hinterbleibt ein Sirup. Es darf nicht so weit verdampft werden, bis der Rückstand fest wird, weil es dann nur unter großen Schwierigkeiten gelingt, ihn bei der Veresterung in Lösung zu bringen. Anderenteils muß doch möglichst alles Wasser entfernt werden. Das Eindampfen wird unterbrochen, sobald der Sirup zähe Blasen wirft. Jetzt übergießt man den Rückstand sofort mit der dreifachen Menge seines Gewichts an absolutem Alkohol und leitet so lange gasförmige Salzsäure ein, bis die Lösung gesättigt ist. Dies ist erreicht, wenn die Lösung anfängt zu rauchen. Das Salzsäuregas wird durch Eintropfenlassen von konzentrierter Schwefelsäure in konzentrierte Salzsäure entwickelt (vgl. Fig 42). Das Gas wird durch zwei *Wulff*sche, mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte Flaschen geleitet, um es zu trocknen. Der Gasstrom soll lebhaft sein. Die alkoholische Lösung gerät während des Einleitens des Salzsäuregases ins Sieden. Am besten läßt man nun die Lösung sich abkühlen und leitet dann nochmals Salzsäuregas bis zur vollständigen Sättigung ein. Es ist darauf zu achten, daß alles in Lösung geht, d. h. kein Rückstand bleibt. Ist ein solcher noch vorhanden, so wird auf dem Wasserbade unter fortwährendem Schütteln gekocht, bis vollständige Lösung eingetreten ist.

Oft bleiben sandartige Massen am Boden des Gefäßes zurück. Meist handelt es sich um Chlorammon. Es wird in den Fällen abfiltriert, in denen man Glykokoll direkt als salzsauren Ester abzuscheiden wünscht.

Die weitere Verarbeitung ist je nach dem Gehalt des angewandten Proteïns an Glykokoll eine verschiedene. Liegt ein nach seiner Zusammensetzung unbekanntes Protein vor, so wird man stets versuchen, etwa vorhandenes Glykokoll in Form seines salzsauren Esters zur Abscheidung zu bringen. Der salzsaure Ester des Glyzins ist in Alkohol schwer löslich.[1]) Man engt die alkoholische Lösung der salzsauren Ester der Aminosäuren am besten auf etwa zwei Drittel ihres Volumens unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades ein. Hierauf versucht man durch Einimpfen eines Kriställchens von Glykokollesterchlorhydrat und längeres (24 Stunden) Stehenlassen der Lösung bei 0° (Eis), den

[1]) Vgl. hierzu: *Emil Fischer*, Notizen II. Quantitative Bestimmung des Glykokolls. Zeitschr. f physiol. Chemie. Bd. **35**. S. 227 (1902).

salzsauren Ester des Glykokolls abzuscheiden. Ist viel Glykokoll vorhanden, so tritt bald reichliche Kristallisation ein. Erwähnt sei noch, daß alle diese Operationen unter möglichster Vermeidung von Wasseranziehung durch den absoluten Alkohol auszuführen sind. Das ausgeschiedene Glykokollesterchlorhydrat wird abgenutscht, mit kaltem Alkohol gewaschen und dann über Kalk und Schwefelsäure im evakuierten Exsikkator getrocknet. Zur weiteren Reinigung wird das Rohprodukt in heißem absolutem Alkohol gelöst, die Lösung



Fig. 42.

mit Tierkohle gekocht und filtriert. Durch Einengen der Mutterlauge des rohen Glykokollesterchlorhydrates lassen sich noch weitere Mengen gewinnen. Schließlich wird die Mutterlauge der letzten Kristallisation mit der Mutterlauge des umkristallisierten Glykokollesterchlorhydrates vereinigt und nunmehr unter vermindertem Druck (10—15 *mm*) bei 40° des Wasserbades zur Trockene verdampft und nun die Veresterung wiederholt. Es wird wiederum dieselbe Menge Alkohol angewandt. Der Versuch, Glykokollesterchlorhydrat abzuscheiden, wird wiederholt und die Veresterung eventuell noch ein drittes

Mal durchgeführt. Gelingt es, den salzsauren Glykokollester möglichst vollständig zur Abscheidung zu bringen, so wird die operative Trennung der einfacheren Aminosäuren sehr erleichtert.

Fehlt das Glykokoll ganz oder ist seine Menge so gering, daß seine Abscheidung nicht eintritt, so wird die ganze Lösung der salzsauren Ester der Aminosäuren unter vermindertem Druck verdampft und die Veresterung noch ein- bis zweimal wiederholt. Schließlich wird der die salzsauren Ester enthaltende Rückstand, nach dem Verjagen des Alkohols und des bei der Veresterung entstehenden Wassers, auf die freien Ester verarbeitet. Es stehen uns zwei Methoden zur Verfügung.

a) Isolierung der Aminosäureester aus den Esterchlorhydraten mit Hilfe von Natronlauge und Kaliumkarbonat und gleichzeitiger Ausätherung.[1])

Der erwähnte Rückstand wird in wenig Wasser vollständig gelöst und die Lösung in eine gute Kältemischung (Kochsalz-Eis-Gemisch) eingestellt. Es ist sehr wichtig, daß einesteils zur Lösung des Sirups nicht zu viel Wasser und auch nicht zu wenig verwendet wird. Im ersteren Falle läuft man Gefahr, daß viele Ester in der wässerigen Lösung teils verseift werden, teils gelöst bleiben, auch ist das Aussalzen der Ester sehr erschwert und erfordert große Mengen von Kaliumkarbonat. Ist zu wenig Wasser verwendet worden, d. h. ist die Lösung dickflüssig, so tritt beim späteren Eintragen von Kaliumkarbonat leicht ein Zusammenballen und -kleben der einzelnen Partikel ein. Die Infreiheitsetzung der Ester aus ihren Chlorhydraten wird dadurch erschwert und unvollständig. Im allgemeinen genügt $^1/_3$—$^1/_2$ des Volumens des Sirups zur vollständigen Auflösung. Man überzeuge sich, daß an den Wänden des Kolbens nichts haften geblieben ist. Es ist auch von Wichtigkeit, daß nicht zuviel Substanz sich im Kolben befindet. In einem 2 *l*-Kolben sollen im allgemeinen nie mehr als 500 *g* Sirup zur Verarbeitung gelangen. Ist der Verdampfungsrückstand größer, so ist es vorteilhaft, seine wässerige Lösung auf mehrere Kolben zu verteilen.

Ist die wässerige Lösung der Aminosäureesterchlorhydrate gut abgekühlt, so überschichtet man sie mit Äther (2—3faches Volumen) und fügt nunmehr vorher gekühlte Natronlauge (33%ige) unter kräftigem Umschütteln in kleinen Mengen zu. Die Menge der zur Befreiung der Ester notwendigen Natronlauge läßt sich nicht genau berechnen, da man einmal die Zusammensetzung des hydrolysierten Proteïns an Aminosäuren nicht kennt und auch die Menge der noch vorhandenen freien Salzsäure zu berücksichtigen wäre. Man könnte durch Titration die Menge des vorhandenen Chlors bestimmen. Gewöhnlich setzt man jedoch schätzungsweise die genügende Menge von Natronlauge zu. Der Äther wird dann nach wiederholtem kräftigem Umschütteln abgegossen und in ein Gefäß hineinfiltriert, das trockenes Kaliumkarbonat enthält. Nach etwa 5 Minuten wird dann

[1]) *Emil Fischer,* Über die Hydrolyse des Kaseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **33**. S. 151 (1901).

die filtrierte, meist dunkelgelb bis braun gefärbte Lösung in eine zweite große Sammelflasche filtriert und in dieser mit geglühtem Natriumsulfat vollends getrocknet. Der Äther wird beim Ausäthern der Ester fortwährend erneuert. Ist die Hauptmenge der Salzsäure mit Natronlauge neutralisiert worden, so fügt man in kleinen Portionen Kaliumkarbonat zu. Man schüttelt den Kolben in der Kältemischung fortwährend energisch um und erneuert den Äther von Zeit zu Zeit. Abwechselnd mit dem Kaliumkarbonat gibt man in kleinen Portionen noch Natronlauge zu. Die ganze Operation wird solange wiederholt, bis der Kolbeninhalt eine einheitliche, bröckelige Masse darstellt. Es ist sehr wichtig, daß ein zu frühes Festwerden der ganzen Masse vermieden wird und vor allem dürfen keine festen Klumpen entstehen. Das Ausäthern wird so lange fortgesetzt, bis der Äther farblos bleibt und auch beim Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterläßt. Die Ausbeute an Estern hängt ganz wesentlich von der Art ihrer Infreiheitsetzung und der Ausätherung ab. Da die schwach basischen Ester der Dikarbonsäuren, der Glutamin- und Asparaginsäure, gegen Alkali sehr empfindlich sind, muß besonders auf eine allmähliche und vorsichtige Zugabe des Alkalis geachtet werden. Läßt man, nachdem die ganze Masse mit Äther erschöpft ist, den körnig-teigigen Rückstand bei gewöhnlicher Temperatur stehen, dann kontrahiert er sich und preßt noch ganz bedeutende Mengen Äther aus.

Der Äther wird, wie oben erwähnt, mit Natriumsulfat getrocknet, dann filtriert und nunmehr bei gewöhnlichem Druck abdestilliert. Um es möglichst zu vermeiden, daß Aminosäureester mit dem Äther übergehen, ist es bei großen Äthermengen ratsam, den Äther nicht vollständig zu verjagen, sondern nur immer einen Teil davon. Es wird dann immer wieder von der ätherischen Lösung der Aminosäureester nachgefüllt, bis schließlich der gesamte Äther zum größten Teil verjagt ist. Die letzten Äthermengen werden dann unter vermindertem Druck bei Zimmertemperatur verdampft und dann wird sofort mit der Destillation der Ester begonnen. Der abdestillierte Äther enthält stets Aminosäureester, und zwar speziell Glykokoll- und Alaninester. Um diese zu gewinnen, schüttelt man den abdestillierten Äther mit verdünnter wässeriger Salzsäure gründlich durch, hebt den Äther ab und verdampft die wässerig salzsaure Lösung zur Trockene. Es verbleiben die salzsauren Aminosäuren. Durch Bestimmung des Drehungsvermögens der wässerigen Lösung dieses Rückstandes kann festgestellt werden, ob d-Alanin vorhanden ist. Mitunter liegt ein Gemisch von salzsaurem Glykokoll und von salzsaurem d-Alanin vor. Ersteres läßt sich leicht durch Veresterung des erwähnten Rückstandes zur Abscheidung bringen. Das d-Alanin gewinnt man aus der Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrates, indem man diese zur Trockene verdampft und dann die Ester in der oben beschriebenen Weise mit Alkali und Kaliumkarbonat in Freiheit setzt. Auch hier wird der Ester in Äther aufgenommen, und dieser nach erfolgter Trocknung mit Natriumsulfat abdestilliert und der verbleibende Rückstand unter vermindertem Druck destilliert. Der auf diese Weise erhaltene Ester

wird durch Kochen mit der 10fachen Menge Wasser verseift und das d-Alanin durch Eindampfen der Lösung erhalten. Wenn das Abdestillieren des Äthers aus der ätherischen Lösung der Gesamtester mit genügender Vorsicht ausgeführt worden ist, enthält übrigens der Äther nur ganz geringe Mengen von Aminosäureestern.

Nach *P. A. Levene* kann man an Stelle von Natronlauge und Kaliumkarbonat mit Vorteil wasserfreien Baryt verwenden. Diese Methode ist besonders dann empfehlenswert, wenn man den nach der Ausätherung der Ester zurückbleibenden Rückstand noch weiter verarbeiten will. Der Baryt wird dann mit Schwefelsäure quantitativ entfernt und das Filtrat vom Baryumsulfat eingedampft.

b) Isolierung der Aminosäureester aus den Esterchlorhydraten mit Hilfe von Natriumalkoholat.[1])

Der nach dem Abdestillieren des Alkohols verbleibende, die Esterchlorhydrate der Aminosäuren enthaltende Rückstand wird in absolutem Alkohol gelöst, filtriert und die klare Lösung in einem Meßkolben auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einem aliquoten Teil wird der Chlorgehalt durch Titration oder besser gravimetrisch ermittelt und nunmehr die berechnete Menge Natrium in so viel Alkohol gelöst, daß eine etwa $2^1/_2{}^0/_0$ige Lösung entsteht. Nachdem die Natriumalkoholatlösung sich abgekühlt hat, wird sie der alkoholischen Lösung der Esterchlorhydrate der Aminosäuren zugesetzt. Es fällt Kochsalz aus. Seine Abscheidung kann durch Zusatz von Äther vervollständigt werden. Erwähnt sei noch, daß jeder Überschuß an Natrium vermieden werden muß, und es besser ist, etwas weniger als die berechnete Menge Natrium anzuwenden; ferner soll die Natriumalkoholatlösung immer frisch bereitet werden. Das ausgefallene Kochsalz läßt sich oft schwer filtrieren. Wird das Gemisch auf Eis gestellt, so setzt sich das Kochsalz bald ab und nimmt eine körnige Beschaffenheit an. Jetzt läßt sich das Kochsalz leicht durch Filtrieren oder Zentrifugieren entfernen. Die alkoholische Lösung der Ester wird nunmehr der fraktionierten Destillation unterworfen. Die erste Fraktion bis 40° bei 10 *mm* Druck enthält fast ausschließlich Alkohol. Sie wird mit wässeriger Salzsäure versetzt und zur Trockene verdampft und der Rückstand genau so behandelt, wie es oben für die aus dem ätherischen Destillat gewonnenen salzsauren Aminosäuren geschildert wurde. Die weitere Verarbeitung der Aminosäureester ist genau dieselbe, wie bei den nach Methode *a)* isolierten.

Fraktionierte Destillation der Monoaminosäureester.

Die Erfahrung hat gelehrt, daß im allgemeinen eine einmalige Destillation der Ester genügt, und ferner hat sich ergeben, daß folgende Art der Fraktionierung meistens ausreichend ist. Die 1. Fraktion wird bis 60° des

---

[1]) *Emil Abderhalden* und *Otto Rostoski*, Beitrag zur Kenntnis des *Bence-Jones*schen Eiweißkörpers. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46. S. 125 (1905).

Wasserbades bei 10—15 *mm* Druck aufgefangen und die 2. Fraktion bis 100° des Wasserbades bei ebenfalls 10—12 *mm* Druck. Die Destillation erfolgt am besten aus einem Claisenkolben (vgl. Bd. I, S. 123, Fig. 251). Die Destillate werden in einfachen Destillierkolben aufgefangen (vgl. Bd. I. S. 152, Fig. 317). Die Vorlagen werden vor der Destillation gewogen, um die Ausbeute an Estern feststellen zu können. Die Vorlage wird mit einer Kältemischung gekühlt und die Destillation bis zu einer bestimmten Temperatur so lange fortgesetzt, bis keine Ester mehr übergehen. Es ist zweckmäßig, ein Thermometer einzuschalten und eventuell die Einteilung der Fraktionen nach den Siedepunkten vorzunehmen. Man beobachtet ab und zu, daß der Quecksilberfaden des Thermometers plötzlich sinkt, ein Zeichen, daß in diesem Augenblicke offenbar bei der momentanen Temperatur des Bades nichts mehr übergeht. Die Pause benutzt man zweckmäßig zur Einschaltung einer neuen Vorlage. Da die Ester die Kautschukstopfen angreifen, ist es zweckmäßig, sie mit einer Korkscheibe nach unten abzuschließen. Das Destillat muß ganz farblos sein. Die Destillation erfolgt ohne Kapillare. Um Siedeverzug zu vermeiden, fügt man Siedestäbchen oder Siedesteinchen zu. Letztere sind jedesmal zu erneuern, wenn die Destillation unterbrochen wird.

Bei den zwei folgenden Fraktionen wird unter stark vermindertem Druck destilliert. Entweder verwendet man eine Ölvakuumpumpe (vgl. Bd. I. S. 151 ff.) oder ein nach *Wohl* und *Losanitsch* erzeugtes Vakuum. Auf beide Arten erhält man eine Druckverminderung auf 0·1—0·5 *mm*. Zunächst wird bei diesem Druck aus dem Wasserbade bis 100° destilliert und dann eine vierte Fraktion unter Verwendung eines Ölbades von 100 bis 180° aufgefangen.

Die drei ersten Fraktionen werden in gleicher Weise sofort verseift, und zwar durch Kochen mit der etwa 10fachen Menge Wasser am Rückflußkühler. Den Grad der Verseifung kontrolliert man durch Prüfung der Reaktion der Flüssigkeit. Solange sie alkalisch reagiert, sind noch unverseifte Ester vorhanden. Gewöhnlich ist die Verseifung nach 6—8 Stunden beendet. Am besten werden nun alle drei Fraktionen unter vermindertem Druck — jede für sich — im gewogenen Kolben vollständig zur Trockene verdampft. Nur dann, wenn nach dem Abkühlen der verseiften Fraktionen eine kristallinische Abscheidung erfolgt ist, lohnt es sich, diese zunächst abzufiltrieren und dann das Filtrat einzuengen. Bei leucinreichen Proteïnen enthält die 2. und namentlich die 3. Fraktion viel Leucin, und es fällt dann diese Aminosäure beim Abkühlen der verseiften Fraktionen aus.

Die gewogenen, eingedampften Fraktionen werden nun mit absolutem Alkohol ausgekocht, um das Prolin in Lösung zu bringen. Das Auskochen wird wiederholt. Die alkoholischen Lösungen trüben sich meistens beim Abkühlen. Es scheiden sich in absolutem Alkohol unlösliche, mit dem Prolin mitgelöste Aminosäuren aus. Sie werden abfiltriert, und dann die aus allen drei Fraktionen vereinigten alkoholischen Filtrate unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird wiederum

in absolutem Alkohol aufgenommen. Es verbleibt ein unlöslicher Rückstand. Dieser Prozeß wird so oft wiederholt, bis alle in Alkohol unlöslichen Bestandteile möglichst entfernt sind.[1]) Diese Reinigung des Prolins ist von größter Wichtigkeit. Man würde einen großen Fehler begehen, wollte man den Rückstand des ersten Alkoholauszuges ohne weiteres als Prolin in Rechnung bringen. Das auf die genannte Art erhaltene Prolin wird nunmehr gewogen und dann durch Kochen mit einem Überschuß von frisch gefälltem Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt. Die tiefblaue Flüssigkeit wird vom ungelösten Kupferoxyd abfiltriert und dann unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird zur Trennung des l-Prolinkupfers vom razemischen Salz mit absolutem Alkohol ausgekocht. Das erstere Kupfersalz geht in Lösung und kann aus der eingeengten Flüssigkeit in Kristallform erhalten werden. Ein Teil des aktiven Prolinkupfers bleibt meist amorph. Zur Identifizierung und Analyse wird meist das razemische Prolinkupfer verwendet. Es ist einmal durch seinen Gehalt an Kristallwasser charakterisiert. Das lufttrockene Präparat enthält 2 Mol. Kristallwasser. Es entweicht erst nach längerem Erhitzen auf 120° im Vakuumtrockenapparat (vgl. Bd. I, S. 296, Fig. 429). Das wasserfreie Kupfersalz ist violett, während das wasserhaltige blau gefärbt ist. Beim Verbrennen des Kupfersalzes entsteht ein charakteristischer Geruch. Die Kupferbestimmung ist auch sehr geeignet, um das Prolinkupfer zu identifizieren. Schließlich kann man auch das Prolin aus dem Kupfersalz in Freiheit setzen, indem man dieses in Wasser suspendiert und Schwefelwasserstoff in die Lösung einleitet. Das Filtrat vom Kupfersulfid wird eingeengt und schließlich mit Alkohol gefällt. Das l-Prolin schmeckt süß und löst sich in Wasser und Alkohol leicht. Es schmilzt bei 206—209° und zeigt $[\alpha]_{20^0}^{D} = -77{\cdot}40^0$. Es kristallisiert aus Alkohol in flachen Nadeln. Zur weiteren Identifizierung können Derivate des Prolins dargestellt werden. Sehr schöne Eigenschaften zeigt das aus der Phenylisocyanatverbindung dargestellte Hydantoin.

Die drei mit Alkohol ausgekochten Fraktionen werden nunmehr in der Weise verarbeitet, daß der in Alkohol unlösliche Teil in Wasser gelöst und, wenn nötig, die Lösung durch Kochen mit Tierkohle entfärbt wird. Jetzt werden alle drei Fraktionen für sich bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt. Dieser Prozeß wird nach dem Abfiltrieren der Kristalle solange wiederholt, bis das gesamte Lösungsmittel verdampft ist. Alle Kristallfraktionen werden nunmehr systematisch untersucht. Sie werden zunächst getrocknet und gewogen, dann ihr Schmelz- resp. Zersetzungspunkt bestimmt. Es sei gleich bemerkt, daß fast alle Aminosäuren beim Erhitzen sich zersetzen und keinen eigentlichen Schmelzpunkt besitzen. Bei der Bestimmung des Zersetzungspunktes ist es erforderlich, rasch zu erhitzen. Die in der

[1]) Hierbei ist zu beachten, daß das razemische Prolin in absolutem Alkohol ziemlich schwer löslich ist. Man darf aus diesem Grunde nicht zu geringe Mengen an Alkohol anwenden.

Literatur niedergelegten Werte für die Zersetzungspunkte der Aminosäuren sind alle durch rasches Erhitzen gewonnen worden. Aus den Zersetzungspunkten können schon mancherlei Schlüsse gezogen werden. Glykokoll zersetzt sich gegen 240°. Alanin gegen 297° und ebenso hoch zersetzt sich Leucin. Der Zersetzungspunkt des Valins liegt gegen 315°. Anhaltspunkte gibt auch der Geschmack: Glykokoll und d-Alanin schmecken ausgesprochen süß, während d-Valin nur schwach süß schmeckt und einen bitteren Nachgeschmack zeigt. l-Leucin schmeckt fad und leicht bitter. Gewöhnlich erhält man einige Kristallfraktionen (die ersten!), die fast ganz aus Leucin bestehen. Es läßt sich leicht durch Umkristallisieren aus heißem Wasser reinigen. Sehr charakteristisch ist auch sein Kupfersalz. Es wird in gleicher Weise gewonnen, wie es beim Prolinkupfer geschildert worden ist. Das Leucinkupfer ist in Wasser sehr schwer löslich. Das ungelöste Kupferoxyd muß energisch mit Wasser ausgekocht werden, sonst erleidet man leicht Verluste. Das Leucinkupfer ist blaßblau, fast weiß.

Schwieriger zu trennen sind Mischungen von Leucin und Valin. Hier führt die fraktionierte Kristallisation oft zum Ziele und auch diejenige des Kupfersalzes. Das d-Valin löst sich ferner in Methylalkohol, während l-Leucin unlöslich ist. Störend wirkt hier die Anwesenheit des Isoleucins, das in der Hitze auch in Methylalkohol sich löst und aus der Mischung mit Valin beim Abkühlen nicht ausfällt. An und für sich ist d-Isoleucin in kaltem Methylalkohol so gut wie unlöslich. Es ist bis jetzt nicht geglückt, eine zuverlässige quantitative Methode zur Trennung von Valin, Leucin und Isoleucin auszuarbeiten.[1]) Gewöhnlich werden Leucin und Isoleucin zusammen bestimmt. Anhaltspunkte dafür, wie rein eine bestimmte Kristallfraktion ist, gibt die Bestimmung der spezifischen Drehung. Sie beträgt für d-Alanin in Wasser + 2·7° und für das salzsaure Salz + 10·3°, für d-Valin + 28·8° in 20%iger Salzsäure und + 6·42° in Wasser, für l-Leucin — 10·34° in Wasser und + 15·9° in 20%iger Salzsäure, für d-Isoleucin + 9·74° in wässeriger Lösung, + 36·80° in 20%iger Salzsäure und + 11·09° in n-Natronlauge. Ferner können verschiedene Derivate zur Identifizierung und auch zur Trennung verwendet werden.

Weniger Schwierigkeiten bereitet im allgemeinen die Trennung von Valin und Alanin. Beide bilden zwar Mischkristalle. Es gelingt jedoch durch sorgfältiges Kristallisieren und Umlösen, diese beiden Aminosäuren in reinem Zustande zu erhalten. Gute Methoden besitzen wir zum Nachweis und zur

[1]) Nach einer mündlichen Mitteilung von *P. A. Levene* gelingt die Bestimmung dieser drei Aminosäuren auf folgendem Wege. Man bestimmt zunächst die elementare Zusammensetzung der gewonnenen Kristalle und berechnet aus den erhaltenen Werten das Verhältnis, in dem Valin und Leucin und Isoleucin vorhanden sind. Nun gibt man die für das Leucin berechnete Menge einer 25%igen Bleizuckerlösung zu (ein Überschuß ist zu vermeiden). Das ausfallende Bleisalz gibt bei der Analyse auf Leucin resp. Isoleucin stimmende Werte. In der Mutterlauge findet sich das Valin, das nach Entfernung des Bleies mit Schwefelwasserstoff leicht zu gewinnen ist. In dem Gemisch von Leucin und Isoleucin können endlich durch Bestimmung des Drehungswinkels die Mengenverhältnisse dieser beiden Aminosäuren festgestellt werden.

Abtrennung des Glykokolls. Wie schon erwähnt, bildet es ein in absolutem Alkohol schwer lösliches Esterchlorhydrat. Zur Prüfung auf Glykokoll werden die tief schmelzenden Kristallfraktionen verwendet. Sehr rasch läßt sich die Frage entscheiden, ob neben Glykokoll noch andere Aminosäuren vorhanden sind. Es genügt, das optische Verhalten der Lösung zu prüfen. Meist findet sich neben Glykokoll noch d-Alanin. Zur Trennung beider Aminosäuren wird entweder die ganze Kristallfraktion oder ein aliquoter Teil derselben mit der 5fachen Menge des Gewichtes der angewandten, fein gepulverten Substanz an absolutem Alkohol übergossen. Nun wird in die Suspension so lange trockene, gasförmige Salzsäure eingeleitet, bis Sättigung eingetreten ist. Hat sich nicht alles gelöst, so wird auf dem Wasserbad solange gekocht, bis alles in Lösung gegangen ist. Nunmehr wird die Lösung auf Eis abgekühlt, mit einem Kriställchen von Glykokollesterchlorhydrat geimpft und gut verschlossen auf Eis aufbewahrt. Von den ausgeschiedenen Kristallen wird nach 12 Stunden abfiltriert. Durch Einengen der Mutterlauge können weitere Abscheidungen bewirkt werden. Das Glykokollesterchlorhydrat schmilzt gegen 144°. Aus der Mutterlauge der letzten Abscheidung setzt man die Ester in der oben geschilderten Weise in Freiheit, destilliert die Ester und verseift sie durch Kochen mit Wasser und gewinnt dann durch Verdampfen der Lösung die noch vorhandenen Aminosäuren. Sehr oft erhält man auf diese Weise reines d-Alanin.

Zur Trennung von Glykokoll und Alanin ist auch das Pikrat sehr geeignet.[1]) Man löst die zu untersuchende Kristallfraktion in wenig heißem Wasser und vermischt sie mit der einfachen Gewichtsmenge Pikrinsäure in alkoholischer Lösung. Beim Abkühlen kristallisiert Glykokollpikrat vom Schmelzpunkt 190° aus, während das Alaninpikrat in Lösung bleibt.

Bei sorgfältiger Fraktionierung der Aminosäureester sind in den drei erwähnten Esterfraktionen außer den genannten Aminosäuren keine anderen vorhanden. Eine ganz andere Art der Verarbeitung tritt bei der 4. Esterfraktion (Ölbad von 100—180°, 0·1—0·5 *mm* Druck) ein. Sie enthält die Ester des Phenylalanins, der Glutaminsäure, der Asparaginsäure und des Serins. Zunächst wird der Phenylalaninester abgetrennt.[2]) Er ist in Äther leicht löslich. Die Esterfraktion wird zunächst mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt. Gewöhnlich trübt sich hierbei die Lösung, indem der Phenylalaninester sich in Form von feinen Tröpfchen abscheidet. Nunmehr wird die Lösung mit dem gleichen Volumen Äther im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die wässerige Lösung verliert ihre Trübung. Sie wird jetzt abgelassen. Die ätherische Lösung enthält den Phenylalaninester und außerdem noch geringe Mengen der anderen Aminosäureester. Um diese zu entfernen, wird die ätherische Lösung wiederholt mit Wasser gewaschen. Die gesamten wässerigen Lösungen werden vereinigt und durch Kochen mit Baryt verseift. Man nimmt ungefähr

[1]) *P. A. Levene*, Glycocoll Picrate. The Journal of Biol. Chemistry. Vol. **1**. p. 413 (1906).

[2]) *Emil Fischer* und *Emil Abderhalden*, Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **36**. S. 268 (1902).

die doppelte Menge des Gewichtes der gesamten Esterfraktion an Baryt, löst diesen in heißem Wasser und filtriert die Lösung in einen ausreichend großen Rundkolben. Nun kühlt man ab und gießt von den ausgeschiedenen Barytkristallen die Mutterlauge ab und bringt nun die erwähnte wässerige Lösung der Ester in den Kolben. Man vermeidet so die Beimischung von Fremdsubstanzen und besonders von Alkalien, die dem käuflichen Baryt meist anhaften. Nun werden die Ester durch zweistündiges Kochen auf dem Wasserbade verseift und die Lösung dann mehrere Tage aufbewahrt. Es erfolgt bald die Abscheidung von razemischem, asparaginsaurem Baryt. Die Kristalle werden abfiltriert und mit 25%iger Schwefelsäure übergossen. Durch Kochen des Gemisches wird die Asparaginsäure in Freiheit gesetzt. Vom schwefelsauren Baryum wird abfiltriert und aus dem Filtrate der Überschuß an Schwefelsäure sorgfältig unter Vermeidung eines Überschusses mit Baryt entfernt. Nun wird das Filtrat vom Baryumsulfat zur Trockene verdampft. Es verbleibt reine Asparaginsäure, die sich leicht durch ihre Eigenschaften und durch die Analyse identifizieren läßt.

Das Filtrat vom asparaginsauren Baryt wird mit Schwefelsäure quantitativ von Baryt befreit und die Lösung nunmehr unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft und gewogen. Der Rückstand wird in Wasser gelöst, wenn nötig mit Tierkohle gekocht, und dann in die klare Lösung bis zur Sättigung gasförmige Salzsäure eingeleitet. Es erfolgt bald Kristallisation von Glutaminsäurechlorhydrat. Wenn die Lösung nicht zu konzentriert ist, so fällt das salzsaure Salz in Form farbloser, großer Kristalle aus, die sich leicht auf Koliertuch abnutschen lassen. Aus der Mutterlauge lassen sich durch Einengen weitere Kristallmassen gewinnen. Das Glutaminsäurechlorhydrat ist meist schon ganz analysenrein. Es läßt sich leicht aus konzentrierter Salzsäure umkristallisieren.

Die Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates enthält Asparaginsäure und Serin. Sie wird unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst und zur möglichsten Entfernung der Salzsäure nochmals eingedampft. Jetzt wird der Rückstand in Wasser gelöst und so lange mit gelbem Bleioxyd gekocht, bis eine nach dem Erkalten entnommene Probe keine Chlorreaktion mehr gibt. Die filtrierte Lösung wird durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreit und dann das Filtrat vom Bleisulfid eingeengt. Es kristallisiert Asparaginsäure aus. In der Mutterlauge findet sich das Serin, und zwar die razemische Form. Es ist stets mit Schwierigkeiten verknüpft, das Serin in guter Ausbeute und in reinem Zustand zu isolieren. Gewöhnlich ist dem Serin noch etwas Asparaginsäure beigemischt, und außerdem finden sich offenbar noch Zersetzungsprodukte, welche die Kristallisation der Säure behindern. Reagiert die Mutterlauge der Asparaginsäure noch sauer, so wird sie mit n-Natronlauge genau neutralisiert und dann eingeengt. Es gelingt so verhältnismäßig leicht, das Serin zum größten Teil zu isolieren. Es kristallisiert meist in Krusten monokliner Kristalle. Es zersetzt sich gegen 240°. Gelingt es nicht, das Serin direkt zur Abscheidung zu bringen, so wird es entweder in

Form seines Methylesterchlorhydrates oder als β-Naphtalinsulfoderivat isoliert.

Erwähnt sei noch, daß die l-Asparaginsäure sich gegen 270—271° zersetzt und in alkalischer Lösung (3 Mol.-Gew. Na[OH]) $[\alpha]^{20°}_{D} = -2\cdot37°$ besitzt, in saurer Lösung (3 Mol.-Gew. HCl) ist die spezifische Drehung = + 26·47°. Die l-Asparaginsäure schmeckt und reagiert sauer. Die d-Glutaminsäure schmilzt gegen 243°. Sie hat einen ganz eigenartigen, für sie charakteristischen Geschmack. Sie schmeckt schwach sauer und hat einen leicht adstringierenden Nachgeschmack. $[\alpha]^{D}_{20°} = +10\cdot5°$ in wässeriger Lösung. Das salzsaure Salz zeigt $[\alpha]^{D}_{20°} = +30\cdot45°$.

Es ist oben erwähnt worden, daß der Phenylalaninester durch Ausäthern von den übrigen Aminosäureestern der vierten Esterfraktion getrennt wird. Der Äther wird abdestilliert und der Rückstand, der den Phenylalaninester enthält, gewogen. Er wird durch Verdampfen mit rauchender Salzsäure verseift. Das salzsaure Phenylalanin läßt sich leicht aus Salzsäure umkristallisieren und reinigen. Es kann entweder direkt analysiert werden, oder man setzt die freie Aminosäure durch Zusatz von Natriumacetat oder Ammoniak in Freiheit. Das l-Phenylalanin kristallisiert in perlmutterglänzenden Blättchen. Es ist in kaltem Wasser schwer löslich. Es zersetzt sich gegen 283° und zeigt $[\alpha]^{20°}_{D} = -35\cdot1°$ in wässeriger Lösung. Es schmeckt leicht bitter. Beim Erhitzen von Phenylalanin mit 25%iger Schwefelsäure und einem Körnchen Kaliumbichromat entsteht der charakteristische Geruch nach Phenylacetaldehyd.

Verarbeitung des bei der Destillation der Ester verbleibenden Rückstandes.

Bei der Destillation der Ester verbleibt stets ein mehr oder weniger großer, meist dunkelbraunrot gefärbter, entweder zähflüssiger oder harter Rückstand. Oft beobachtet man an den Wänden des Destillationskolbens kristallinische Abscheidungen. Diese lassen sich zum Teil mit Essigäther in Lösung bringen und bestehen aus Anhydriden von Aminosäuren. So erhält man beim Auskochen mit Essigäther z. B. Leucinimid[1]) bei an Leucin reichen Proteïnen. Der Rückstand enthält bei Anwendung von Seide stets größere Mengen von Serinanhydrid[2]), und zwar ein Gemisch von razemischem und aktivem Serinanhydrid. Ferner finden sich meist wechselnde Mengen von Tyrosinester und schließlich lassen sich durch längeres Kochen des Rückstandes mit konzentriertem Barytwasser größere Mengen von Glutaminsäure gewinnen.[3])

[1]) *Emil Abderhalden*, Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 484 (1903).

[2]) *Emil Fischer*, Vorkommen von l-Serin in der Seide. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 1501 (1907).

[3]) *Emil Abderhalden* und *Otto Rostoski*, Die Monoaminosäuren des „Edestins" aus Baumwollsamen und dessen Verhalten gegen Magensaft. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **44**. S. 265 (1905).

Bei der Verarbeitung des Destillationsrückstandes wird am besten so vorgegangen, daß er zunächst mit siedendem Essigäther möglichst erschöpft wird. Dann gibt man etwa die zweifache Menge des Gewichtes des Rückstandes an Baryt zu und kocht nach Zusatz von Wasser 16 Stunden am Rückflußkühler. Der Baryt wird nun quantitativ mit Schwefelsäure entfernt, das Filtrat vom Baryumsulfat stark eingeengt und durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure die Glutaminsäure als salzsaures Salz zur Abscheidung gebracht. Es kann auf diesem Wege die Ausbeute an Glutaminsäure ganz erheblich gesteigert werden. Auch Leucin, Phenylalanin und Asparaginsäure lassen sich nachweisen. Man kann den Destillationsrückstand nach der Behandlung mit Baryt und dessen Entfernung mit Schwefelsäure auch nach der Estermethode auf vorhandene Aminosäuren untersuchen. Der direkte Versuch hat ergeben, daß eine solche Aufarbeitung sich im allgemeinen nicht lohnt.

Wiederholung des Veresterungsprozesses.

Es gelingt nicht, bei der Anwendung von Alkali- und Kaliumkarbonat die Aminosäureester quantitativ zu gewinnen. Ein Teil der Ester bleibt in Wasser gelöst und ein Teil wird ohne Zweifel unter dem Einfluß des Alkalis verseift. Einen erheblichen Teil von Aminosäureestern kann man noch gewinnen, wenn die Veresterung wiederholt wird.[1]) Zunächst wird das bei der Infreiheitsetzung der Ester aus den Hydrochloraten verbliebene Gemisch in Wasser gelöst, vorsichtig Salzsäure zugegeben und schließlich gasförmige Salzsäure eingeleitet. Vom ausfallenden Chlorkalium wird abfiltriert und das Filtrat eingeengt, bis Kristallisation erfolgt. Der ganze Prozeß wird so oft wiederholt, als die abfiltrierten Kristallmassen sich noch frei von organischer Substanz erweisen. Schließlich wird die stark eingeengte Masse mit Alkohol übergossen und gasförmige Salzsäure eingeleitet. Die organische Substanz geht vollständig in Lösung. Von den ungelösten anorganischen Salzen (KCl) wird abfiltriert. Das Filtrat wird dann unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades zur Trockene verdampft und die Veresterung wiederholt. Im übrigen wird genau so verfahren, wie es oben geschildert worden ist. Es werden die Ester wieder in Freiheit gesetzt, fraktioniert, destilliert, verseift und schließlich die Aminosäuregemische getrennt. Der ganze Prozeß kann schließlich auch ein zweites Mal wiederholt werden.

Isolierung von l-Oxyprolin.[2])

Das l-Oxyprolin läßt sich aus dem von Aminosäureestern und von Salzen in der oben beschriebenen Weise möglichst befreiten Rückstande

[1]) *Emil Abderhalden*, Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **37**. S. 484 (1903). — Derselbe, Hydrolyse des Edestins. Ebenda. Bd. **37**. S. 499 (1903).

[2]) *Emil Fischer*, Über eine neue Aminosäure aus Leim. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 2660 (1902).

verhältnismäßig leicht gewinnen. Die Veresterung wird nicht wiederholt, sondern der in Wasser gelöste Rückstand unter vermindertem Druck verdampft, um möglichst viel Salzsäure zu entfernen. Die verbleibende Lösung wird dann in so viel Wasser gelöst, daß die Lösung etwa 1% an organischer Substanz enthält und so viel Schwefelsäure zugefügt, bis die Lösung etwa 5% davon aufweist. Nun wird mit einer etwa 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag scharf abgenutscht und schließlich bei etwa 300 Atmosphären Druck auf der hydraulischen Presse ausgepreßt. Es hinterbleibt eine steinharte Masse, die sich leicht pulvern läßt. Durch Zerlegen mit Baryt können aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag die unter dem Namen „Hexonbasen" zusammengefaßten Aminosäuren isoliert werden, nämlich Histidin, Lysin und Arginin. Die Methoden der Darstellung dieser Verbindungen sind an anderer Stelle beschrieben.

Im Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wird durch Baryt die überschüssige Phosphorwolframsäure gefällt, und der überschüssige Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat vom Baryumsulfat wird unter vermindertem Druck stark eingeengt. Die Lösung enthält noch Salzsäure. Um diese zu entfernen, schüttelt man die Flüssigkeit mit überschüssigem Silbersulfat, filtriert dann ab, fällt das gelöste Silber genau mit Salzsäure und die Schwefelsäure mit Baryt. Das Filtrat vom Baryumsulfat wird nunmehr unter vermindertem Druck möglichst stark eingeengt und dann im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure vollends bis zum Sirup eingedunstet. Nach längerem Stehen tritt Kristallisation ein. Zum Nachweis des Oxyprolins ist die β-Naphtalinsulfoverbindung sehr geeignet.

Einfacher gestaltet sich die Isolierung des Oxyprolins, wenn die Aminosäureester mit Hilfe von Natriumalkoholat in Freiheit gesetzt werden. Das Oxyprolin findet sich dann im Destillationsrückstand. Er wird in Wasser gelöst, die Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt und das Filtrat der Fällung in ganz analoger Weise, wie es eben beschrieben worden ist, auf Oxyprolin verarbeitet.

Das l-Oxyprolin kristallisiert in farblosen Tafeln. Es schmeckt süß und zeigt $[\alpha]_D^{20^0} = -81.04^0$ in wässeriger Lösung. Schmelzpunkt gegen 270° unter Aufschäumen und Bräunung.

Mit der Beschreibung der Isolierung des l-Oxyprolins haben wir bereits eine Aminosäure erwähnt, die nicht direkt mit Hilfe der Estermethode isoliert werden kann. Es sind noch eine Reihe von einfachen Spaltprodukten der Proteïne bekannt, die zu ihrer Isolierung besonderer Methoden bedürfen. Hierher gehören l-Tyrosin, Cystin, l-Tryptophan, d-Glukosamin und ferner Histidin, Lysin und Arginin. Die Isolierung der letzten drei Verbindungen wird an anderer Stelle geschildert.

Isolierung von Tyrosin.

Zur quantitativen Bestimmung des Tyrosins wählt man am besten die Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure. 16stündiges Kochen am Rückfluß-

kühler genügt. Das meist dunkelgelb gefärbte Hydrolysat wird mit Baryt quantitativ von der Schwefelsäure befreit und der abfiltrierte oder besser abzentrifugierte Baryumsulfatniederschlag so lange mit Wasser ausgekocht, bis eine Probe des Filtrats keine Reaktion mit *Millons* Reagenz mehr gibt. Nun werden die Waschwässer mit dem ersten Filtrat des Baryumsulfatniederschlages vereinigt und eingeengt, bis Kristallisation eintritt. Dieser Prozeß wird nach Entfernung der Kristalle wiederholt und zwar so lange, als die jeweilige Mutterlauge noch eine Reaktion auf Tyrosin gibt. Die vereinigten Kristallmassen, die noch sehr unrein sind, werden aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert. Die Mutterlauge des Tyrosins kann, wie oben erwähnt, zur Darstellung von Glutaminsäure verwendet werden, auch können die übrigen, oben erwähnten Aminosäuren unter Anwendung der Estermethode bestimmt werden. Erwähnt sei, daß man das Tyrosin auch dann isolieren kann[1]), wenn zur Hydrolyse rauchende Salzsäure verwendet worden ist. In diesem Falle wird das Hydrolysat unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand wiederholt in Wasser aufgenommen und die Lösung wieder verdampft, um möglichst viel Salzsäure zu entfernen. Nun wird der Rückstand wieder in Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle gekocht, filtriert und das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einem aliquoten Teil der gesamten Flüssigkeit wird der Chlorgehalt titrimetrisch festgestellt und nun durch Zusatz der berechneten Menge 33%iger Natronlauge in der Kälte die Salzsäure in der Hauptmenge der Flüssigkeit neutralisiert. Es fällt sofort Tyrosin aus.

Das Rohtyrosin ist meist sehr unrein und oft sehr schwer zu reinigen. Diese Beobachtung wurde speziell bei dem aus Kasein gewonnenen Tyrosin gemacht. Ihre weitere Verfolgung ergab, daß dem Tyrosin Körper beigemischt waren, die mit Phosphorwolframsäure fällbar sind. Zwei dieser Verbindungen sind isoliert worden. Die eine erwies sich als Lysin und die andere zeigte die Zusammensetzung $C_{12} H_{26} N_2 O_5$. Das erstere, das an und für sich in Wasser leicht löslich ist, war offenbar in Form einer schwer löslichen Kombination dem Tyrosin beigemischt gewesen. Sie tritt offenbar nicht immer auf, denn sie ist später nur noch einmal zur Beobachtung gelangt. Die Menge des Lysins war auch gering. Die andere, erwähnte Verbindung, die gleichfalls durch Fällung mit Phosphorwolframsäure vom Tyrosin abgetrennt werden kann, ist schwer löslich in Wasser und tritt in größerer Menge auf (im Kasein ist etwa 1% davon enthalten). Sie wird aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag durch dessen Zerlegung mit Baryt gewonnen. Zunächst läßt sich durch Umkristallisieren des Rohtyrosins aus heißem Wasser ein Teil des Tyrosins leicht entfernen, die Mutterlauge gibt dann Fraktionen, die mit Phosphorwolframsäure fallen. Am besten wird die Mutterlauge der ersten reinen Tyrosinfraktionen nach Zugabe von Schwefelsäure, bis die Lösung 5% davon enthält, direkt mit

[1]) *Emil Abderhalden* und *Yutaka Teruuchi*, Notiz zur Darstellung von Tyrosin aus Seide. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 48. S. 528 (1906).

Phosphorwolframsäure gefällt. Die Verbindung $C_{12}H_{26}N_2O_5$ ist offenbar nicht die einzige vorhandene Verbindung dieser Art. In ihrer Mutterlauge scheinen sich noch andere, noch nicht genau untersuchte, homologe Verbindungen zu befinden.

Das l-Tyrosin ist durch seine Schwerlöslichkeit in Wasser charakterisiert, ferner durch verschiedene Farbenreaktionen. So färbt sich seine Lösung mit *Millons* Reagenz intensiv rot. Wird Tyrosin in einigen Tropfen warmer konzentrierter Schwefelsäure gelöst, die Lösung in Wasser gegossen und mit Baryumkarbonat neutralisiert, filtriert und zu dem neutralen Filtrat ein Tropfen neutraler Eisenchloridlösung zugesetzt, so tritt eine schön violette Farbe auf (*Pirias* Probe). Gibt man ferner etwas festes Tyrosin zu einigen Kubikzentimetern einer aus 1 Volumen Formalin, 45 Volumen Wasser und 55 Volumen konzentrierter Schwefelsäure bestehenden Lösung, so erhält man beim Sieden eine Grünfärbung *(Denigès-Mörner)*. l-Tyrosin zersetzt sich gegen 314—318°. $[\alpha]_D^{20°} = -8{\cdot}64°$ in 21%iger Salzsäure und $-13{\cdot}2°$ in 4%iger Salzsäure.

Isolierung des Cystins.[1])

Auch hier wird am besten mit rauchender Salzsäure hydrolysiert. Das meist dunkel gefärbte Hydrolysat wird durch Kochen mit Tierkohle möglichst entfärbt und das Filtrat mit 33%iger Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Nach längerem Stehen in der Kälte tritt Kristallisation ein. Am besten wartet man mehrere Tage zu und filtriert dann ab. Der Filterrückstand enthält im wesentlichen Tyrosin und Cystin. Um die beiden Aminosäuren zu trennen, wird das Gemisch in heißem, 10%igem Ammoniak gelöst, die Lösung abgekühlt und nun Eisessig bis zur schwach alkalischen oder neutralen Reaktion zugegeben. Es fällt zunächst Tyrosin aus. Zur Abscheidung des Cystins wird die Mutterlauge des Tyrosins mit Eisessig übersättigt. Das erhaltene Cystin darf mit *Millons* Reagenz keine Reaktion mehr geben. Tritt Rotfärbung ein, dann muß die Abtrennung in gleicher Weise nochmals wiederholt werden.

Isolierung des Tryptophans.[2])

Zur Gewinnung des Tryptophans ist die Hydrolyse der Proteïne mit Säuren nicht geeignet. Zu seiner Darstellung verwendet man am besten

---

[1]) *K. A. H. Moerner,* Cystin, ein Spaltungsprodukt der Hornsubstanz. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 28. S. 595 (1899). — Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteïnstoffen. Ebenda, Bd. **34**. S. 207 (1901/02). — *E. Friedmann,* Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Beziehungen der schwefelhaltigen Eiweißabkömmlinge. 1. Mitteilung. Über die Konstitution des Cystins. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **3**. S. 1 (1902). — *Emil Abderhalden,* Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobin aus Pferdeblut. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **37**. S. 484 (1903).

[2]) *F. Gowland Hopkins* and *Sydney W. Cole,* A contribution to the chemistry of proteids. I. Preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion.

durch Trypsin verdautes Eiweiß. 6—8tägige Dauer der Fermenthydrolyse genügt meist. Eine Kontrolle, ob genügend Tryptophan abgespalten ist, gibt die Bromreaktion, die nur von der freien Aminosäure gegeben wird und deren Intensität uns einen ungefähren Anhaltspunkt gibt, wann die größte Menge Tryptophan frei in der Verdauungsflüssigkeit vorhanden ist. Nun wird die Verdauungsflüssigkeit auf 80° erwärmt, filtriert und dann das klare Filtrat mit 5 Volumprozent Schwefelsäure und einem Überschuß einer 10%igen Quecksilbersulfatlösung in 5 volumprozentiger Schwefelsäure versetzt. Es entsteht ein voluminöser Niederschlag. Er wird abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, dann in Wasser suspendiert und unter Erwärmung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach Vertreiben des Schwefelwasserstoffs aus dem Filtrat des Quecksilbersulfids durch Kohlensäure wird die Lösung wiederum mit 5% ihres Volumens an Schwefelsäure versetzt und mit so viel Quecksilbersulfatlösung, daß sich gerade ein zusammenhängender Niederschlag bildet. Dieser wird nach einer halben Stunde abgesaugt. Es gelingt so, das zuerst ausfallende Cystin und ferner Verharzungsprodukte zu entfernen. Das Filtrat vom genannten Niederschlag wird nun weiterhin mit überschüssiger Quecksilbersulfatlösung gefällt, die Fällung abgesaugt und mit 5%iger Schwefelsäure so lange gewaschen, als das Waschwasser sich mit *Millons* Reagenz rot färbt. Der Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, dann wird filtriert und im Filtrat die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt gefällt. Nun wird unter vermindertem Druck nach Zusatz von wenig Alkohol eingeengt. Die Temperatur des Wasserbades soll hierbei 40° nicht übersteigen. Bald beginnt dann die Abscheidung von Tryptophan. Durch Umkristallisieren aus verdünntem (50%igem) Alkohol unter Zusatz von Tierkohle wird es ganz rein erhalten. Erwähnt sei, daß häufig und vielleicht immer eine Verbindung von der Zusammensetzung $C_{11}H_{12}N_2O_3$, vorläufig Oxytryptophan genannt, zur Beobachtung kommt, das seiner Schwerlöslichkeit wegen sich leicht vom Tryptophan abtrennen läßt.

Die Darstellung des Tryptophans läßt sich insofern noch vereinfachen, als zur Zerlegung des Quecksilbersulfatniederschlages fein gepulvertes Baryumsulfid verwendet werden kann.[1])

Isolierung des d-Glukosamins.

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis des d-Glukosamins unter den Spaltungsprodukten der Proteïne besitzen wir zurzeit noch keine so guten Methoden, wie für die Gewinnung der Aminosäuren. Sehr häufig ist der Gehalt von Proteïnen an „Kohlehydraten“ nur indirekt erschlossen worden. Im Prinzip sind alle Methoden zum Nachweis des d-Glukosamins

Journ. of physiol. Vol. 27. p. 418 (1901). — II. The constitution of tryptophane, and the action of bacteria upon it. Ebenda. Vol. 29. p. 451 (1903). — Vgl. auch: *Emil Abderhalden* und *Martin Kempe*, Beitrag zur Kenntnis des Tryptophans und einiger seiner Derivate. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52. S. 207 (1907).

[1]) *Emil Abderhalden*, Weiterer Beitrag zur Kenntnis von l-Tryptophan enthaltenden Polypeptiden. 3. Mitt. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 42. S. 2331 (1909).

und verwandter Substanzen gleichartig.[1]) Die Hydrolyse der Proteïne wird stufenweise durchgeführt, um eine Zerstörung von etwa vorhandenen Kohlehydraten und speziell von Glukosamin zu vermeiden. Zur Hydrolyse wird 5—10%ige Salzsäure oder Bromwasserstoffsäure oder auch Alkali verwendet. Die komplizierteren Eiweißabbauprodukte werden dann ausgefällt, z. B. mit Alkohol, und im Filtrat, dessen Reduktionsvermögen geprüft wird, das vorhandene Kohlehydrat nach weiterer Hydrolyse mit verdünnter Säure, z. B. 5%iger Schwefelsäure, z. B. als Benzoylverbindung isoliert. Nach allen Erfahrungen ist das Glukosamin im Eiweiß und speziell in den Muzinen in Form komplizierterer Verbindungen vorhanden.

Im Anschluß an die erwähnten Aminosäuren sei noch kurz erwähnt, daß bei der Spaltung der Proteïne mit Säuren neben den Aminosäuren noch Produkte auftreten, die in die Reihe der Diketopiperazine gehören.

Isolierung von Diketopiperazinen aus den durch kochende, rauchende Salzsäure oder durch Kochen mit 25%iger Schwefelsäure erhaltenen Spaltprodukten.[2])

Die Hydrolyse wird in der schon erwähnten Weise durchgeführt. Hat man Salzsäure verwendet, so wird die Hydrolysenflüssigkeit, nachdem sie filtriert worden ist, unter vermindertem Druck verdampft, der Rückstand mehrmals in Wasser gelöst und wieder zur Trockene eingeengt. Dann wird der sirupöse Rückstand am besten mit geglühter Kieselgur vermischt und die nunmehr bröcklige Masse im Soxhlet mit Essigäther extrahiert. Hat man mit Schwefelsäure hydrolysiert, so wird diese zunächst quantitativ mit Baryt entfernt, und das Filtrat vom Baryumsulfat unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird dann, wie oben beschrieben, behandelt. Der Essigäther wird verdunstet. Es bleiben Anhydride von Dipeptiden zurück. Sie werden durch Kristallisieren aus Wasser, Alkohol, Aceton usw. getrennt und gereinigt.

Erwähnt sei noch, daß das bei der Hydrolyse der Proteïne stets in mehr oder weniger großen Mengen sich bildende Ammoniak nach den gewöhnlichen Methoden der Ammoniakbestimmung bestimmt wird.

Gang der Untersuchung auf Aminosäuren bei geringen Substanzmengen.

Bei sehr geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen wird sich oft die Notwendigkeit ergeben, möglichst viele Aminosäuren wenigstens

[1]) Vgl. hierzu: *F. Müller,* Untersuchungen über die physiologische Bedeutung und die Chemie des Schleimes der Respirationsorgane. Sitzungsber. d. Gesellsch. zur Bef. d. ges. Naturwiss. zu Marburg. 1896. Nr. 6 und Die Chemie des Muzins und der Mukoide. Ebenda. 1898. Nr. 6. — Beiträge zur Kenntnis des Muzins und einiger damit verwandter Eiweißstoffe. Zeitschr. f. Biol. Bd. **42**. S. 468 (1901). — *Leo Langstein,* Die Kohlehydrate des kristallinischen Serumalbumins. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **1**. S. 259 (1901). — Die Kohlehydrate des Serumglobulins. Monatshefte f. Chem. Bd. **24**. S. 445 (1903).

[2]) *Emil Abderhalden* und *Casimir Funk,* Beitrag zur Kenntnis der beim Kochen von Kaseïn mit 25%iger Schwefelsäure und mit starker Salzsäure entstehenden Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **53**. S. 19 (1907).

qualitativ nachzuweisen. In diesem Falle wählt man zur Hydrolyse 25%ige Schwefelsäure. Will man das Tryptophan mitbestimmen, so kann man auch eine Verdauung mit Pankreassaft voranschicken und den mit Quecksilbersulfat nicht fällbaren Teil der Verdauungsflüssigkeit nach Entfernung des gelösten Quecksilbers mit Schwefelwasserstoff, mit Schwefelsäure hydrolysieren. Zunächst wird die Hydrolysenflüssigkeit nach 16stündigem Kochen mit soviel Wasser versetzt, daß ihr Gehalt an Schwefelsäure nur noch 5% beträgt. Nun werden die „Diaminosäuren" mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat der Fällung wird nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit Baryt und Fällung von dessen Überschuß mit Schwefelsäure zunächst auf Tyrosin verarbeitet. Die Mutterlauge vom Tyrosin wird stark eingeengt und nun durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure die Glutaminsäure als salzsaures Salz abgeschieden. Die Mutterlauge vom Glutaminsäurechlorhydrat wird zur Trockene verdampft. Der Rückstand dient nun nach erfolgter Veresterung zur Bestimmung der oben angeführten, mit Hilfe der Estermethode nachweisbaren Monoaminosäuren. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird zerlegt und auf Histidin, Lysin und Arginin verarbeitet.

Besondere Methoden zur Darstellung einzelner Monoaminosäuren.

Zur Darstellung von synthetisch aufgebauten Polypeptiden und speziell von optisch-aktiven Formen sind größere Mengen von Aminosäuren nötig. Es sind zur Gewinnung einzelner besondere Materialien ausgesucht und zum Teil auch besondere Methoden ausgearbeitet worden, so für das Glykokoll, d-Alanin, l-Serin, l-Prolin, d-Isoleucin, l-Tyrosin und für die d-Glutaminsäure. Diese Methoden seien hier kurz beschrieben.

1. Darstellung von Glykokoll.

Am besten geht man von Seidenabfällen, eventuell auch von Leim aus. Die Hydrolyse wird in der erwähnten Weise mit der 3fachen Menge rauchender Salzsäure ausgeführt und schließlich das Hydrolysat zur Trockene verdampft und der Rückstand verestert. Das Glykokoll wird als Esterchlorhydrat abgeschieden und durch Umkristallisieren aus heißem Alkohol unter Anwendung von Tierkohle in ganz reinem Zustande erhalten. Die Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrats kann, wenn Seide als Ausgangsmaterial diente, noch zur Darstellung von d-Alanin verwendet werden.

2. Darstellung von d-Alanin.[1]

Hierzu eignet sich die Seide am besten. Es wird zunächst in der oben beschriebenen Weise das Glykokoll als salzsaurer Ester möglichst vollständig abgetrennt. Je besser es gelingt, das Glykokoll zu entfernen, um so reineres d-Alanin erhält man. Die Mutterlauge der letzten Abscheidung von Glykokollesterchlorhydrat wird unter vermindertem Druck völlig

[1]) Vgl. *Emil Fischer*, Synthese von Polypeptiden. XIV. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. XXXIX. S. 453 (1906).

zur Trockene verdampft. Nunmehr werden die Ester nach einer der oben beschriebenen Methoden in Freiheit gesetzt. Die Aminosäureester werden dann bei einem Druck von 10—15 *mm* destilliert. Bis 40° des Wasserbades geht hauptsächlich Alkohol über. Dieser Vorlauf wird für sich aufgefangen. Von 55° an beginnt dann die Hauptmenge des d-Alaninesters überzugehen. Man läßt die Temperatur bis 80° ansteigen und destilliert so lange, bis bei dieser Temperatur nichts mehr übergeht. Das Destillat wird in der gewohnten Weise durch Kochen mit Wasser verseift und aus der wässerigen Lösung das d-Alanin durch fraktionierte Kristallisation gewonnen. Die Reinheit des d-Alanins wird am besten durch Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens seines salzsauren Salzes bestimmt. Aus 1000 *g* Seidenabfällen erhält man 250—300 *g* Glykokoll und etwa 150 *g* reines d-Alanin. Die Ausbeute an diesen Aminosäuren hängt natürlich ganz wesentlich von der Beschaffenheit der Seidenabfälle ab.

3. Darstellung von l-Serin.[1])

Wir besitzen zurzeit noch keine Methode, um größere Mengen von l-Serin aus Proteïnen direkt zu isolieren. Vorläufig sind wir auf den folgenden Weg zur Gewinnung von l-Serin aus den Spaltungsprodukten der Proteïne angewiesen. In Betracht kommt als Ausgangsmaterial nur die Seide. Sie enthält ziemlich viel Serin. Die Seide wird in der gewohnten Weise auf Aminosäuren verarbeitet. Die Aminosäureester werden destilliert. Im Destillationskolben verbleibt ein ziemlich beträchtlicher Rückstand. Er ist dunkelgelbbraun gefärbt und zunächst dickflüssig. Nach einiger Zeit tritt Kristallisation ein. Sie kann durch Erhitzen des Rückstandes auf dem Wasserbade beschleunigt und vervollständigt werden. Diese Kristalle erwiesen sich als Serinanhydrid, und zwar findet man neben aktivem (l-) Serinanhydrid auch die razemische Form. Hat man Kristalle gewonnen, so kann man leicht aus der Mutterlauge weiteres Serinanhydrid in Kristallform erhalten, indem man die dickflüssige Masse in der 2—3fachen Menge absoluten Alkohols löst und nun nach erfolgter Abkühlung einige Kriställchen vom Serinanhydrid einträgt. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank haben sich weitere Kristallmassen abgeschieden.

Die erwähnten beiden Formen von Serinanhydrid lassen sich verhältnismäßig leicht durch fraktioniertes Kristallisieren aus Wasser trennen. Das inaktive Serinanhydrid ist in Wasser schwerer löslich als das aktive. Letzteres dient zur Bereitung von l-Serin. Es wird das l-Serinanhydrid 4 Stunden mit der 10fachen Menge 48%iger Bromwasserstoffsäure auf 100° erwärmt. Die Lösung wird dann unter einem Druck von 12—15 *mm* zum Sirup verdampft, dieser in der etwa 40fachen Menge Alkohol gelöst und nun tropfenweise wässeriges Ammoniak in einem kleinen Überschuß zugefügt. Das l-Serin fällt kristallinisch aus. Die Ausbeute an l-Serin ist nicht sehr groß. Sie beträgt etwa 1 *g* aus 100 *g* Seide.

[1]) *Emil Fischer,* Vorkommen von l-Serin in der Seide. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **40**. S. 1501 (1907).

4. Darstellung von l-Prolin.[1])

Sehr geeignet zur Gewinnung von l-Prolin ist die Gelatine. Sie ist leicht zugänglich und enthält relativ viel von dieser Aminosäure. Zur Isolierung des Prolins wird ebenfalls die Estermethode angewandt. Die Ester werden aus den Esterchlorhydraten nach einer der beiden oben geschilderten Methoden in Freiheit gesetzt, nachdem der Äther und der Alkohol bei 10—12 *mm* Druck und 40° des Wasserbades abdestilliert worden sind, ohne weitere Fraktionierung bei 0·1—0·5 *mm* Druck bis 100° des Wasserbades abdestilliert und sofort durch Kochen mit der 8—10fachen Menge Wasser verseift. Die wässerige Lösung der Aminosäuren wird nunmehr unter vermindertem Druck eingedampft und der verbleibende Rückstand mit absolutem Alkohol wiederholt ausgekocht. Das Prolin geht in Lösung. Es löst jedoch auch andere, an und für sich in dem angewandten Lösungsmittel unlösliche Aminosäuren mit. Ein Teil davon fällt schon beim Abkühlen der Lösung aus. Zur weiteren Reinigung des Prolins wird seine alkoholische Lösung so oft unter vermindertem Druck eingedampft, bis der jeweilen verbleibende Rückstand sich leicht in Alkohol löst. Das so erhaltene Prolin besteht aus wechselnden Mengen l- und dl-Prolin. Ein Teil des letzteren kann dadurch entfernt werden, daß das erhaltene Rohprolin mit kaltem Alkohol ausgelaugt wird. Das razemische Prolin ist in Alkohol schwerer löslich als das l-Prolin. Rascher kommt man zum Ziel, wenn man das gesamte Rohprolin durch Kochen mit überschüssigem Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt und nach dem Filtrieren die tiefblaue Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Nun wird der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Das aktive Prolinkupfer geht in Lösung. Es scheidet sich beim Einengen der Lösung in langgestreckten Blättchen und Prismen ab. Die Kristalle werden abfiltriert, in Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Kupfersulfid enthält das reine l-Prolin. Es läßt sich durch Eindunsten der Lösung in Kristallform erhalten. Am besten kristallisiert man es aus Alkohol um. Die Ausbeute an l-Prolin schwankt. Aus 1 *kg* Gelatine erhält man etwa 60 *g* gereinigtes Rohprolin (Gemisch von l- und dl-Prolin). Daraus lassen sich zirka 40 *g* rohes l-Prolin isolieren. Ein beträchtlicher Teil des aktiven Prolinkupfers kristallisiert nicht. Aus diesem Grunde schrumpft schließlich die Ausbeute an aktivem Prolin auf etwa 20—30 *g* zusammen.

5. Darstellung von d-Glutaminsäure.

Zur Gewinnung von d-Glutaminsäure verwendet man am besten die an dieser Aminosäure reichen Pflanzeneiweißstoffe, wie z. B. das Gliadin. Es ist vorteilhaft, möglichst reine, an Kohlehydraten und sonstigen Beimengungen arme Proteïne zu wählen. Gliadin aus Weizenmehl liefert z. B.

[1]) *Emil Fischer* und *Emil Abderhalden*, Synthese von Polypeptiden. V. Derivate des Prolins (α-Pyrrolidinkarbonsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 37. S. 3072 (1904).

30—37% reine Glutaminsäure, je nach seiner Reinheit. Zur Isolierung der Glutaminsäure hydrolysiert man das Proteïn am besten mit rauchender Salzsäure.

Die Hydrolysenflüssigkeit, die meist dunkel gefärbt ist, wird mit ziemlich viel Tierkohle aufgekocht, filtriert und unter vermindertem Druck stark eingeengt. Nach Einleiten von gasförmiger Salzsäure wird die salzsaure Lösung nach Einimpfen eines Kriställchens von Glutaminsäurechlorhydrat bei 0° aufbewahrt. Bald erfolgt Kristallisation. War die Lösung nicht zu stark eingeengt und nicht zu sehr verunreinigt, so gelingt es leicht, große, reine Kristalle von Glutaminsäurechlorhydrat zu gewinnen. Im anderen Falle erhält man sehr feine Kriställchen. Diese schließen stets Mutterlauge ein und lassen sich meist nicht gut absaugen und abpressen. Oft erfolgt auch die Kristallisation recht unvollkommen. Es tritt diese Erscheinung besonders unangenehm dann auf, wenn die salzsaure Lösung sehr dunkel gefärbt ist. In diesen Fällen wird die Lösung mit Wasser verdünnt, unter vermindertem Druck völlig eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und wieder verdampft, um möglichst viel Salzsäure zu entfernen. Man kann nun oft durch Kochen mit Tierkohle völlige Entfärbung herbeiführen. Gelingt dies nicht, dann wird die Lösung mit Kupferoxydul im Überschuß geschüttelt und so die Hauptmenge der Salzsäure entfernt. Die filtrierte, schwach grünblau gefärbte Lösung wird dann durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom gelösten Kupfer befreit. Nach der Filtration erhält man nun eine nur leicht gelb gefärbte Lösung, aus der nach dem Einengen und Einleiten von gasförmiger Salzsäure nunmehr die Glutaminsäure leicht und vollständig in mehreren Kristallfraktionen abzuscheiden ist. Schließlich werden diese vereinigt und aus Salzsäure umkristallisiert. Es ist klar, daß nur das ganz reine Produkt als Ausbeute berechnet werden darf. Das unreine Produkt enthält stets Beimengungen. Es sei noch erwähnt, daß man auch nach erfolgter Hydrolyse mit Schwefelsäure in gleicher Weise die Glutaminsäure bestimmen kann, indem man nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt in das stark konzentrierte Filtrat des Baryumsulfats gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung einleitet.

6. Darstellung von l-Tyrosin.

Zur Gewinnung von l-Tyrosin sind am besten Seidenabfälle geeignet. Entweder führt man die Hydrolyse in der oben beschriebenen Weise mit 25%iger Schwefelsäure durch und isoliert dann das Tyrosin durch Einengen der mit Baryt quantitativ von Schwefelsäure befreiten Flüssigkeit. Handelt es sich um rasche Darstellung größerer Mengen von l-Tyrosin, so wird mit Vorteil folgendes Verfahren angewandt.[1]) Die Seidenabfälle werden in der üblichen Weise durch 6stündiges Kochen mit rauchender Salzsäure hydrolysiert. Die Hydrolysenflüssigkeit wird dann nach erfolgter Filtration unter

[1]) *Emil Abderhalden* und *Yutaka Teruuchi*, Notiz zur Darstellung von Tyrosin aus Seide. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 540 (1904).

vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft und der Rückstand in möglichst wenig Wasser aufgenommen und die Lösung eventuell noch einmal eingedampft. Schließlich wird in der Lösung der Chlorgehalt festgestellt und dann die berechnete Menge Natronlauge zugegeben. Das Tyrosin fällt als braunschwarze Masse aus. Sie wird abfiltriert und in siedendem Wasser gelöst und die Lösung durch Kochen mit Tierkohle entfärbt. Man kann die Hydrolysenflüssigkeit auch nach einmaligem Verdampfen unter vermindertem Druck direkt mit soviel Natronlauge versetzen, bis eine Fällung auftritt. Die Ausbeute an Tyrosin schwankt bei Verwendung von 1000 *g* Seide zwischen 40 und 60 *g*.

Die Mutterlauge des Tyrosins kann auf Glykokoll und d-Alanin weiterverarbeitet werden. Sie wird unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, der Rückstand mit Alkohol übergossen und gasförmige trockene Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Von den ungelöst bleibenden Salzen wird abfiltriert und nun in der gewohnten Weise das Glykokollesterchlorhydrat abgeschieden und aus dessen Mutterlauge das d-Alanin aus dem in Freiheit gesetzten und destillierten Ester dargestellt.

7. Darstellung von d-Isoleucin.[1])

Bis jetzt ist d-Isoleucin fast ausschließlich aus Melasseschlempe gewonnen worden. Unzweifelhaft kommt Isoleucin auch in anderen Eiweißarten vor, und vielleicht findet es sich stets mit der Aminoisobutylessigsäure, dem gewöhnlichen Leucin, zusammen. Einstweilen ist eine gute, allgemein verwendbare Isolierungsmethode für Isoleucin nicht ausgearbeitet. Die Anwesenheit von Valin stört die Reindarstellung von Isoleucin. Es sei deshalb nur das Darstellungsverfahren von Isoleucin aus Melasseschlempe geschildert. Am besten wird konzentrierte Strontian-Melasseschlempe verwendet. Sie enthält in größerer Menge kristallinische Produkte, die durch Absaugen entfernt werden. Es verbleiben 15—20% der Trockensubstanz der Strontian-Melasseschlempe auf dem Filter. Der Rückstand besteht zu etwa $^2/_3$ aus organischer Substanz. Er enthält noch Mutterlauge und wird, ohne diese ganz zu entfernen, am besten in einer Kugelmühle zu je 1 *kg* mit 2 *l* 95%igem Alkohol und 100 cm^3 25%igem wässerigem Ammoniak überschichtet und tüchtig geschüttelt. Nach $^1/_2$—1 Stunde ist das Leucin in Lösung gegangen. Das ammoniakalisch-alkoholische Extrakt wird nun abgegossen, mit Tierkohle aufgekocht und die filtrierte Lösung unter vermindertem Druck eingeengt, bis aller Alkohol entfernt ist. Aus dem verbleibenden Sirup scheiden sich bald Kristalle ab, und nach einigem Stehen bei niedriger Temperatur ist die ganze Masse erstarrt. Sie wird abgesaugt, scharf abgepreßt, mit Alkohol gewaschen und schließlich bei 100° getrocknet. Das so gewonnene Rohleucin enthält nur Spuren von Asche. Aus 1 *kg* des breiigen Nieder-

[1]) *Felix Ehrlich*, Über das natürliche Isomere des Leucins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 37. S. 1809 (1904).

schlages der Melasseschlempe erhält man so etwa 25—30 *g* eines ziemlich reinen Rohleucins. Aus diesem wird nun das Isoleucin in folgender Weise abgetrennt. Das Rohleucin wird in Wasser gelöst, mit überschüssigem, frisch gefälltem Kupferoxyd gekocht, die heiße Lösung filtriert und der Filterrückstand wiederholt mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat keine blaue Farbe mehr zeigt. Die vereinigten Flüssigkeiten werden nun unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft und der Rückstand mit reinem, konzentriertem Methylalkohol, am besten in einem Extraktionsapparat, extrahiert. Hierbei geht das Isoleucinkupfer in Lösung. Durch Verdampfen der tiefblauen Lösung und Lösen des Rückstandes in 90%igem Methylalkohol läßt sich das Kupfersalz in reinem Zustand gewinnen. Durch Behandeln der wässerigen Lösung des Salzes mit Schwefelwasserstoff erhält man das freie Isoleucin. Es läßt sich aus verdünntem Alkohol umkristallisieren. Die Eigenschaft des Isoleucinkupfers, in wasserfreiem Methylalkohol löslich zu sein, ist vorläufig das wesentlichste Mittel, um Isoleucin von gewöhnlichem Leucin zu trennen.

Die zur Identifizierung der einzelnen Monoaminosäuren wichtigsten Derivate.

1. Darstellung von β-Naphtalinsulfoderivaten.[1]

Die Kuppelung der Aminosäuren mit β-Naphtalinsulfochlorid wird unter folgenden Bedingungen herbeigeführt. 2 Mol.-Gew. ganz reines β-Naphtalinsulfochlorid werden in Äther gelöst und zu einer Lösung der Aminosäure in der für ein Molekül berechneten Menge Normalnatronlauge hinzugefügt. Am besten verwendet man eine gewöhnliche Stöpselflasche. Das Gemisch wird nun auf der Schüttelmaschine bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt. In Intervallen von ein bis anderthalb Stunden fügt man dann noch dreimal die gleiche Menge Normalalkali zu. Nun wird die ätherische Schicht abgehoben, die wässerige Lösung filtriert und mit Salzsäure übersättigt. Dabei fällt die schwerlösliche Naphtalinsulfoverbindung aus. Je nach der Art der Aminosäure tritt mehr oder weniger leicht Kristallisation ein. Die erhaltenen Produkte lassen sich durch ihre Eigenschaften und ihre Schmelzpunkte und vor allem durch die Analyse leicht identifizieren. Es ist im allgemeinen nicht ratsam, diese Derivate zur Trennung von Gemischen verschiedenartiger Aminosäuren zu verwenden. Während es verhältnismäßig leicht gelingt, eine bereits möglichst gut gereinigte Aminosäure mit Hilfe der β-Naphtalinsulfoverbindung zur Kristallisation zu bringen, ist es recht schwierig, ein Gemisch zu trennen. Vor allem zeichnet sich ein solches durch die Schwierigkeit aus, in Kristallform überzugehen.

---

[1]) *Emil Fischer* und *Peter Bergell*, Über die β-Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **35**. S. 3779 (1902).

2. Darstellung von Phenylisocyanatverbindungen und der entsprechenden Hydantoine.

Beispiel: Phenylisocyanatverbindung des l-Prolins[1]): 1·8 *g* l-Prolin werden in 15 *cm*³ Normalnatronlauge gelöst und nach guter Abkühlung 2 *g* Phenylisocyanat in kleinen Portionen unter dauerndem, kräftigem Schütteln zugefügt. Zum Schluß wird die Lösung mit etwas Tierkohle durchgeschüttelt, filtriert und angesäuert. Die Phenylcyanatverbindung fällt als harzige Masse. Sie zeigt wenig Neigung zum Kristallisieren und wird deshalb sofort in das Hydantoin übergeführt. Die Phenylcyanatverbindung wird in 4%iger Salzsäure gelöst und die Lösung auf dem Wasserbade eingeengt. Es treten bald Kristalle auf.

In manchen Fällen besitzt auch die Phenylcyanatverbindung gute Eigenschaften und läßt sich leicht in Kristallform gewinnen.

Zur Trennung von Aminosäuregemischen dürften sich die Hydantoine in bestimmten Fällen als ganz brauchbar erweisen. Meist wird man jedoch die Aminosäuren als solche trennen und erst zur Identifizierung die Phenylcyanatverbindung darstellen.

3. Darstellung von Benzoylverbindungen.

Beispiel: Darstellung von Benzoyl-alanin.[2]) 3 *g* Alanin werden in 30 *cm*³ Wasser gelöst, dann 22 *g* gepulvertes Natriumbikarbonat und in kleinen Portionen 14·5 *g* Benzoylchlorid (3 Mol.) hinzugegeben. Nun wird bei Zimmertemperatur tüchtig geschüttelt. Nach ca. 1 Stunde wird die filtrierte Flüssigkeit mit Salzsäure übersättigt. Es scheidet sich ein dicker Kristallbrei ab. Er besteht aus Benzoylalanin und Benzoësäure. Das Gemisch wird nach einigem Warten abfiltriert, gewaschen, getrocknet und dann zur Entfernung der Benzoësäure mit Ligroïn ausgekocht.

Es ist sehr wesentlich, daß bei der Darstellung der Benzoylverbindungen der Aminosäuren an Stelle des sonst zur Benzoylierung üblichen Alkalis Natriumbikarbonat verwendet wird.

4. Darstellung von Formylverbindungen.

Beispiel: Formyl-leucin.[3]) Leucin wird mit der 1½fachen Menge wasserfreier, käuflicher Ameisensäure (von 98·5%) 3 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, wobei es genügt, den Kolben mit einem kurzen, zu einer Kapillare ausgezogenen Steigrohr zu versehen. Dann verdampft man unter einem Druck von etwa 20 *mm* das Lösungsmittel möglichst

---

[1]) Vgl. *Emil Fischer,* Über die Hydrolyse des Kaseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 151 (1901).

[2]) *Emil Fischer,* Über die Spaltung einiger razemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 2451 (1899).

[3]) *Emil Fischer* und *Otto Warburg,* Spaltung des Leucins in die optisch-aktiven Komponenten mittelst der Formylverbindung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **38**. S. 3997 (1905).

vollständig. Die zurückbleibende Lösung wird abermals mit der gleichen Menge Ameisensäure 3 Stunden auf 100° erhitzt, dann wieder abdestilliert und diese Operation mehrmals wiederholt. Beim Verdampfen erstarrt der Rückstand kristallinisch. Der Kristallbrei wird abfiltriert und mit ungefähr der $1^1/_2$fachen Menge eiskalter n-Salzsäure verrieben, um das noch unveränderte Leucin zu lösen, dann scharf abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen, um alle Salzsäure zu entfernen. Das Rohprodukt wird aus der 3fachen Menge Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert.

5. Darstellung von Verbindungen der Aminosäuren mit Kohlensäure.[1]

Beispiel: Glykokollkarbonsaures Calcium. Die wässerige Lösung von Glykokoll wird unter Kühlung mit Kohlensäure gesättigt und dann Kalkmilch zugefügt. Sie löst sich zunächst auf. Nun wird wieder Kohlensäure eingeleitet und dies einigemal wiederholt. Zuletzt wird Kalkmilch und kristallisiertes Calciumkarbonat eingetragen, geschüttelt und filtriert. Das völlig klare Filtrat wird mit gekühltem Alkohol bis zur starken Trübung versetzt. Es scheidet sich nun das Kalksalz der Glykokollkarbonsäure aus.

Weitere zur Identifizierung geeignete Derivate sind die 4-Nitrotoluol-2-sulfoderivate[2]) und die α-Naphtylisocyanatverbindungen.[3]) Zur Identifizierung des Serins ist die p-Nitrobenzoylverbindung ganz besonders geeignet.[4]) [5])

---

[1]) *M. Siegfried*, Über die Bindung von Kohlensäure durch amphotere Amidokörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44**. S. 85 (1905) und Bd. **46**. S. 401 (1905).

[2]) *M. Siegfried*, Über Derivate von Aminosäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **43**. S. 68 (1904).

[3]) *Carl Neuberg* und *A. Manasse*, Die Isolierung der Aminosäuren. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **38**. S. 2359 (1905). — *Carl Neuberg* und *E. Rosenberg*, Über die α-Naphtylisocyanatverbindungen einiger Aminosäuren. Biochemische Zeitschr. Bd. 5. S. 456 (1907).

[4]) *Emil Fischer* und *Walter A. Jacobs*, Spaltung des razemischen Serins in die optisch-aktiven Formen.

[5]) Über die Eigenschaften der einzelnen Derivate siehe die Zusammenstellung von *Emil Abderhalden*, Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der speziellen Eiweißchemie. Gustav Fischer, Jena 1909.

b) Isolierung von Histidin, Lysin und Arginin[1] (Ornithin und Guanidin).

Von **H. Steudel,** Berlin.

Prinzip der Methode.

Das Prinzip der Isolierung besteht darin, die drei Basen aus der zu untersuchenden Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure abzuscheiden und dann die aus dem Niederschlag wieder durch Baryt in Freiheit gesetzten Basen mit Hilfe von Silbernitrat, respektive Silbersulfat, und Baryt zu trennen in eine unlösliche Fraktion (Silbersalze des Histidins und Arginins) und in ein Filtrat, aus dem durch Phosphorwolframsäure und endlich durch Pikrinsäure das Lysin gewonnen werden kann. Man kann unter Umständen auch so vorgehen, daß man aus der zu untersuchenden Flüssigkeit erst das Histidin und Arginin als Silberverbindungen entfernt und nun im Filtrat mit Phosphorwolframsäure und Pikrinsäure das Lysin gewinnt. Man hat in diesem Falle nicht die erste Phosphorwolframsäurefällung nötig. Histidin und Arginin werden in Form ihrer Silberverbindungen getrennt, von denen die erste bei Zusatz von Baryumkarbonat ausfällt, die zweite aber erst in stark alkalischer Lösung durch Baryt niedergeschlagen wird.

[1]) Die Methode ist geschildert nach *F. Weiß,* Untersuchungen über die Bildung des Lachsprotamins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **52**. S. 108 (1907). Die Fällung des Arginins durch Silbernitrat oder Sulfat und Barytwasser ist zuerst von *A. Kossel* in der Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25. S. 177, die Abscheidung des Lysins ebenda, Bd. **26**. S. 586 beschrieben. Die Trennung von Arginin und Histidin sowie die heute gebräuchliche Methode in ihren wesentlichen Grundzügen ist zuerst beschrieben von *A. Kossel* und *Fr. Kutscher,* Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31. S. 165 (1900). Hinzugekommen sind einige Verbesserungen: Trennung des Histidins und Arginins als Silberverbindungen durch Baryumkarbonat (*A. Kossel* und *H. Pringle,* Über Protamine und Histone. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **49**. S. 318, 1906), ferner Wägung der Pikrolonate des Arginins und Histidins (*H. Steudel,* Das Verhalten der Hexonbasen zur Pikrolonsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 219 (1903); Bd. **44**. S. 157 (1905).

Zur quantitativen Bestimmung von Histidin, Lysin und Arginin im Eiweiß mittelst Hydrolyse wird der zu untersuchende Eiweißkörper in einer entsprechenden Menge, je nach dem Stickstoffgehalt, z. B. 20—50 *g*, mit einer Mischung der dreifachen Menge seines Gewichtes konzentrierter Schwefelsäure und der sechsfachen Menge seines Gewichtes Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Es ist zweckmäßig, zunächst auf dem Wasserbade so lange zu erhitzen, bis alles in Lösung gegangen ist und das lästige Schäumen aufgehört hat (1—$1\frac{1}{2}$ Stunden). Dann setzt man den Kolben in ein Ölbad und reguliert dessen Temperatur sorgfältig, so daß kein Stoßen eintritt. Die Spaltungsflüssigkeit wird sodann mit Wasser verdünnt, filtriert, zum Liter aufgefüllt und zur Feststellung des Gesamtstickstoffs in 10 cm^3 derselben der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt.

Entfernung der Schwefelsäure und des Huminstickstoffs. Bestimmung des Ammoniaks.

Die schwefelsaure Lösung wird zum Sieden erhitzt und zwecks Abstumpfung der zur Spaltung in Verwendung gebrachten Schwefelsäure nach und nach bis zur schwach sauren Reaktion mit einer kochend heißen konzentrierten Ätzbarytlösung versetzt. Der entstandene Niederschlag von schwefelsaurem Baryt, von dem auch stickstoffhaltige Körper, die sogenannten Huminstoffe, mit niedergerissen und festgehalten werden, wird abgesaugt, dreimal mit Wasser verrieben und ausgekocht, abgenutscht und so lange mit kochendem Wasser ausgewaschen, bis die abtropfende Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure keine Fällung mehr gibt.

Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und durch Eindampfen auf 1 *l* gebracht. Alsdann wird in 10 cm^3 der Flüssigkeit nach *Kjeldahl* der Stickstoff bestimmt. Zieht man die so gefundene Stickstoffmenge von dem Gesamtstickstoff ab, so erhält man den im Barytniederschlag zurückgebliebenen „Huminstickstoff I".

Die gesamte Flüssigkeit versetzt man nun mit verdünnter Ätzbarytlösung bis zur eben neutralen Reaktion, dann mit ungefähr 5 *g* Baryumkarbonat, das zuvor in der Reibschale fein zerrieben und mit Wasser zu einem dünnen Brei aufgeschwemmt war.

Das bei der Spaltung gebildete Ammoniak wird beim Erhitzen der Flüssigkeit dadurch in Freiheit gesetzt und kann durch Destillation mit Wasserdampf übergetrieben und durch Auffangen in $\frac{1}{10}$-Normalsäure zur Titration gebracht werden. Es ist dabei natürlich notwendig, aus dem Destillat die mitübergegangene Kohlensäure zuerst durch Aufkochen zu entfernen.

Die auf diese Weise behandelte Flüssigkeit wird filtriert, das auf dem Filter bleibende Gemisch von Baryumkarbonat und -sulfat dreimal mit Wasser ausgekocht und mit heißem Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt, mit Schwefelsäure angesäuert, stark eingedampft, nötigen-

falls nochmals filtriert und zum Liter aufgefüllt. In 10 cm^3 der Flüssigkeit wird dann der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Aus dieser Bestimmung erfährt man unter Berücksichtigung des gefundenen Ammoniaks die Menge des im alkalischen Barytniederschlag verbliebenen „Huminstickstoffs II".

Fällung von Histidin und Arginin als Silberverbindungen.

Die nunmehr erhaltene schwefelsaure Flüssigkeit wird in einen geräumigen Kolben gebracht und kalt mit kochend heißer Silbersulfatlösung[1]) versetzt. Das Hinzufügen dieser Lösung geschieht allmählich unter zeitweisem kräftigem Umschwenken so lange, bis die Menge des zugesetzten Silbers ausreicht. Wann letzteres der Fall ist, kann, wie folgt, ermittelt werden. In ein Uhrglas auf schwarzer Unterlage gibt man Barytwasser. Wird durch einen mittelst Glasstab zugefügten Tropfen obiger Flüssigkeit im Barytwasser ein rein weißer oder hellgelber Niederschlag erzeugt, so genügt die Menge des zugesetzten Silbersulfats nicht. Diese reicht aus, wenn durch die Tropfenprobe im Barytwasser ein braungelber Niederschlag entsteht.

Trifft dies zu, so kühlt man die Flüssigkeit gut ab, sättigt sie mit gepulvertem Ätzbaryt, d. h. man fügt so lange von dieser Substanz zu, bis diese auch nach längerem Umschwenken ungelöst am Boden des Gefäßes liegen bleibt, läßt den entstandenen Niederschlag absitzen und nutscht ihn alsdann ab. Dann reibt man denselben samt Filter in einer Reibschale unter Zuhilfenahme von mittelst Säure gereinigtem Seesand mit Barytwasser bestens an, saugt ihn nochmals ab, wäscht ihn mit barythaltigem Wasser gründlich aus und schwemmt ihn schließlich samt Filter in schwefelsäurehaltigem Wasser bis zur sauren Reaktion auf.

Der Niederschlag wird nach A und B, die abgenutschte Flüssigkeit nach C behandelt.

A. Bestimmung des Histidins.

Der mit schwefelsäurehaltigem Wasser unter Zuhilfenahme von Sand fein zerriebene und aufgeschwemmte Niederschlag wird mittelst Schwefelwasserstoffs zerlegt; die Flüssigkeit wird nach beendetem Einleiten zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht, der Schwefelsilber und Baryumsulfat enthaltende Niederschlag abgenutscht, wiederholt ausgekocht und bis zum Ausbleiben der Phosphorwolframsäurereaktion sorgfältig heiß gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und durch Eindampfen auf 1 *l* gebracht. Alsdann wird in 20 cm^3 nach *Kjeldahl* die Menge des Stickstoffs der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen bestimmt.

[1]) Bei nicht quantitativen Bestimmungen mit Silbernitrat.

Die Flüssigkeit wird nun mit Barytwasser genau neutralisiert, gelöstes Baryumnitrat zugesetzt, solange noch die Entstehung eines Niederschlags zu beobachten ist, filtriert und der Niederschlag bestens ausgewaschen. Das Filtrat wird durch Eindampfen auf 300 *cm*³ gebracht und in einem Kochkolben nach dem Ansäuern mit Salpetersäure mit einem kleinen Überschuß, d. h. so lange mit einer konzentrierten Lösung von Silbernitrat versetzt, bis eine Tropfenprobe in Barytwasser einen braungelben Niederschlag erzeugt.

Ist dies erreicht, so wird mit Barytwasser nochmals schwach sauer oder eben neutral gemacht, aufgeschwemmtes Baryumkarbonat zugesetzt, die Flüssigkeit zunächst im Wasserbade angewärmt, dann auf dem Drahtnetz zum einmaligen Aufkochen erhitzt und zum Absetzen und Erkalten beiseite gestellt.

Der Histidinsilber haltende Niederschlag wird nun abfiltriert und kalt mit schwach barythaltigem Wasser (5—6 Tropfen einer 5⁰/₀igen Ätzbarytlösung auf 100 *cm*³ Wasser) bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion sorgfältig ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und zur Argininbestimmung reserviert.

Der argininfreie Niederschlag wird im Kolben mit schwefelsäurehaltigem Wasser zur sauren Reaktion erhitzt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Flüssigkeit zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht, das Schwefelsilber abfiltriert, wiederholt ausgekocht und mit siedendem Wasser bis zum Verschwinden der Phosphorwolframsäurereaktion völlig erschöpft. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und durch Eindampfen auf 250 *cm*³ gebracht; alsdann wird in 25—50 *cm*³ der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Aus dem durch diese Bestimmung gefundenen N-Wert wird das Histidin berechnet.

Der Rest der Flüssigkeit wird mittelst Ätzbaryt heiß von der überschüssigen Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, eingedampft und vom ausgeschiedenen Baryumkarbonat und -sulfat abfiltriert. Filtrat und Waschwasser des wiederholt heiß gewaschenen Niederschlages werden vereinigt, nochmals eingedampft, nötigenfalls durch wenige Tropfen verdünnter Schwefelsäure von den letzten Spuren Baryt befreit und auf etwa 10 *cm*³ gebracht.

Diese Flüssigkeit dient zur genaueren Bestimmung des Histidins in Form des gut kristallisierenden und schwerlöslichen Salzes mit Pikrolonsäure, die von *Steudel* in die physiologische Chemie eingeführt worden ist. Nach Maßgabe der vorher ausgeführten Kjeldahlbestimmung kann man die Menge der zur Ausfällung erforderlichen Pikrolonsäure berechnen. Man fügt einen geringen Überschuß der in wenig heißem Alkohol gelösten Pikrolonsäure hinzu, saugt das entstandene Pikrolonat nach 3 Tagen ab, wäscht es mit wenig Wasser aus, trocknet bei 100⁰ und bringt es zur Wägung. Das Histidin ist nach der Formel $C_{10} H_8 N_4 O_5 . C_6 H_9 N_3 O_2$ aus dem Pikrolonat zu berechnen.

B. Bestimmung des Arginins.

Zu der vom Histidinsilber abfiltrierten Flüssigkeit gibt man bis zur völligen Sättigung gepulverten Ätzbaryt, saugt den entstandenen Niederschlag ab, reibt diesen unter Zuhilfenahme von Seesand samt Filter nochmals mit Barytwasser gut an und wäscht ihn damit bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion völlig aus. Dann wird der Niederschlag mit schwefelsäurehaltigem Wasser zur sauren Reaktion angerieben und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Flüssigkeit wird alsdann zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht, das Schwefelsilber abfiltriert, wiederholt ausgekocht und mit siedendem Wasser völlig erschöpft. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt, durch Eindampfen auf 500 cm^3 gebracht und in 25—50 cm^3 der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Aus dem gefundenen Stickstoffwert wird das Arginin berechnet. Der Rest wird mittelst Baryumhydroxyds heiß von der überschüssigen Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, eingedampft, vom abgeschiedenen Baryt abfiltriert, das Filtrat mit dem Waschwasser des wiederholt heiß gewaschenen Niederschlages nochmals eingedampft, nötigenfalls mit wenigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure von den letzten Spuren Baryt befreit und auf 10 cm^3 gebracht. In dieser eingeengten Lösung wird das Arginin nach dem von *Steudel* angegebenen Verfahren mittelst der berechneten Menge Pikrolonsäure, die zuvor in wenig heißem Alkohol gelöst ist, gefällt. Die abgeschiedenen schwefelgelben Nadeln werden nach Ablauf einiger Tage auf dem Filter gesammelt, zunächst wiederholt mit der Mutterlauge, dann mit wenig Wasser gewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen. Die Löslichkeit dieses Pikrolonates in Wasser ist sehr gering und beträgt nach *Steudel* 1 : 1124. Hieraus läßt sich der in der Mutterlauge verbliebene Rest des Pikrolonats leicht berechnen. Ebenso kann man die Reinheit des Pikrolonats durch die Schmelzpunktbestimmung leicht prüfen. Diese gewichtsanalytische Methode gibt, verglichen mit den bei der Kjeldahlbestimmung gefundenen Werten, beim Arginin sehr gute, beim Histidin zufriedenstellende Resultate.

C. Bestimmung des Lysins.

Das Filtrat von dem Niederschlag, der Arginin und Histidin als Silberverbindungen enthält, säuert man zur Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure an und befreit es durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Silber, dann kocht man den Schwefelsilber enthaltenden Barytniederschlag nochmals aus und wäscht ihn mit siedendem Wasser gründlich nach. Filtrat und Waschwasser werden auf 500 cm^3 gebracht; dann versetzt man die Flüssigkeit, nachdem ihr Stickstoffgehalt zur Kontrolle, ob der Barytniederschlag völlig erschöpft ist, festgestellt wurde, mit Schwefelsäure bis zu 4 Volumprozent, fällt unter Vermeidung eines größeren Überschusses mit Phosphorwolframsäure, d. h. fügt solange von einer Lösung dieser Substanz zu, bis die vom gebildeten Niederschlag

abfiltrierte Flüssigkeit auf weiteren Zusatz von Phosphorwolframsäure 10 Sekunden klar bleibt, und untersucht den Phosphorwolframsäureniederschlag auf seinen Lysingehalt.

Er wird nach 24stündigem Stehen abgesaugt, vom Filter genommen, in der Reibschale mit 4 volumprozentiger Schwefelsäure angerieben und mit dieser sorgfältig gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und auf ein bestimmtes Volumen gebracht; in dieser Flüssigkeit wird alsdann nach *Kjeldahl* der Stickstoffgehalt der durch Phosphorwolframsäure nicht gefällten Stoffe festgestellt.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird nun, nachdem er zuvor mit Wasser zu einem gleichmäßigen Brei angerieben worden ist, in kochendes Wasser eingetragen; diese heiße Flüssigkeit wird bis zur stark alkalischen Reaktion mit einer heißen konzentrierten Ätzbarytlösung versetzt. Das unlösliche Barytsalz wird abgesaugt, mehrmals unter Zusatz von Ätzbaryt ausgekocht und bis zum Ausbleiben der Phosphorwolframsäurereaktion mit heißem Wasser gewaschen. Die alkalischen Filtrate werden sofort durch Einleiten von Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, zunächst auf freiem Feuer eingeengt, filtriert, dann auf dem Wasserbade fast zur Trockene eingedampft, mit Wasser aufgenommen, vom kohlensauren Baryt abfiltriert, nochmals eingedampft, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und noch einmal der Stickstoff nach *Kjeldahl* in einer gemessenen Menge bestimmt.

Der in seinem Aussehen harzig erscheinende Rückstand wird nun mit einer geringen Menge alkoholischer Pikrinsäurelösung unter Zusatz von Alkohol angerührt. Zu dieser alkoholischen Lösung setzt man am besten in einer weißen Schale nach und nach jeweils in kleinsten Mengen solange eine konzentrierte alkoholische Lösung von Pikrinsäure, als die Bildung eines Niederschlages zu beobachten ist. Das ausgeschiedene Pikrat wird nach 24 Stunden abfiltriert, mit sehr wenig absolutem Alkohol gewaschen, in siedendem Wasser gelöst, die Lösung nötigenfalls filtriert und durch Eindampfen auf ein kleines Volumen gebracht. Beim Erkalten scheidet sich das Lysinpikrat in nadelförmigen Kristallen ab, die auf gewogenem Filter gesammelt, mit wenig Alkohol gewaschen, getrocknet und gewogen werden.

Aus diesem Pikrat berechnet sich das Lysin nach der Formel:

$$C_6\,H_4\,N_2\,O_2\,.\,C_6\,H_2\,(NO_2)_3\,OH.$$

Die Mutterlaugen werden vereinigt, durch Erhitzen vom Alkohol befreit, mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 4 Volumprozent angesäuert und durch Äther von der ausgeschiedenen Pikrinsäure befreit. Hierauf wird die durch Erwärmen ätherfrei gemachte Lösung nochmals mit Phosphorwolframsäure gefällt und der gebildete Niederschlag nach der oben geschilderten Methode auf Lysin verarbeitet.

Dieses Verfahren wird solange wiederholt, als durch alkoholische Pikrinsäure noch Niederschläge von Lysinpikrat erzielt werden. Bei vorsichtigem Zusatz von Pikrinsäure in den vorhergehenden Fällungen, d. h. bei Vermeidung eines wieder lösend wirkenden Überschusses derselben,

pflegt die Ausbeute an Lysinpikrat aus dem dritten Phosphorwolframsäureniederschlag bereits so gering zu sein, daß sie vernachlässigt werden kann.

Bemerkungen.

Will man die einzelnen Basen nicht quantitativ bestimmen, sondern sie nur präparativ darstellen, so ist diese geschilderte Methode ebenfalls zu empfehlen, man kann dann statt des Silbersulfats das leichter lösliche Silbernitrat nehmen, desgleichen ist sie gut geeignet zur Aufteilung des Gemisches, das z. B. durch fermentative Einwirkung auf Eiweißkörper entsteht.

Zu beachten ist aber, daß dann in die einzelnen Fraktionen unter Umständen auch noch andere Körper hineingehen können, so daß eine sorgfältige Reinigung der kristallisierten Salze der Basen und Untersuchung der verbliebenen Mutterlaugen notwendig ist.

So können in der Histidinfraktion, sobald nicht reines Eiweiß als Ausgangsmaterial genommen wurde, Thymin, Uracil und Cytosin gefunden werden; die Argininfraktion, mit Pikrolonsäure ausgefällt, hinterläßt eine Mutterlauge, aus der eventuell Guanidin[1]) als Pikrat isoliert werden kann. Reines Guanidin gibt ein schwer lösliches Pikrat, die Fällung wird aber durch die Gegenwart von Arginin verhindert[2]), so daß sich erst nach Entfernung des Arginins das Guanidin nachweisen läßt.

Ferner findet sich bei dem beschriebenen analytischen Gang in der Lysinfraktion gegebenenfalls das Ornithin vor, das aus Arginin durch Einwirkung von Alkalien[3]) oder durch Fermentwirkung[4]) (Arginase) entsteht. Hier kann unter Umständen auch Cholin[5]) (entstanden durch Spaltung des Lecithins) isoliert werden, zuweilen auch die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Monoaminosäuren.

Handelt es sich um die präparative Darstellung einer einzigen Base in größeren Mengen, so ist die beschriebene Methode für die Gewinnung von Arginin oder Lysin durchaus zweckmäßig, für die Bereitung von

---

[1]) *J. Otori,* Die Spaltung des Pseudomucins durch starke siedende Säuren. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **42**. S. 458 (1904). — *Fr. Kutscher* und *J. Otori,* Der Nachweis des Guanidins unter den bei der Selbstverdauung des Pankreas entstehenden Körpern. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 98 (1904).

[2]) *Fr. Kutscher* und *J. Otori,* Der Nachweis des Guanidins unter den bei der Selbstverdauung des Pankreas entstehenden Körpern. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 101 (1904).

[3]) *E. Schulze* und *Winterstein,* Über die Bildung von Ornithin bei der Spaltung des Arginins und über die Konstitution dieser beiden Basen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **26**. S. 1 (1898). Siehe auch *A. Kossel* und *Fr. Weiss,* Über die Einwirkung von Alkalien auf Proteïnstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **60**. S. 313 (1909).

[4]) *A. Kossel* und *H. D. Dakin,* Über die Arginase. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **41**. S. 321 (1904). Weitere Untersuchungen über fermentative Harnstoffbildung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **42**. S. 181 (1904).

[5]) *Fr. Kutscher* und *A. Lohmann,* Die Endprodukte der Pankreas- und Hefeselbstverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **39**. S. 162 (1903).

Histidin in größerer Quantität eignet sich besser folgende Angabe unter Benutzung des *Kossel*schen Quecksilberchloridverfahrens[1]):

Darstellung von Histidin.

Rohes Rinderblut wird mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und bis zur vollständigen Lösung im Ölbade gekocht, oder es wird direkt auf zwei Teile Blut 1 Teil konzentrierter Salzsäure genommen und diese Mischung 10 Stunden gekocht. Dann wird der größte Teil der Salzsäure fortgedampft, mit Soda bis zur schwach sauren Reaktion neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wird weiter mit Soda deutlich alkalisch gemacht und durch Kochen das Ammoniak vertrieben, filtriert und nun bei dauernd schwach alkalischer Reaktion mit Quecksilberchlorid ausgefällt. Der Niederschlag wird noch einmal in wenig Salzsäure gelöst, filtriert und wieder mit Soda, Sublimat und viel Wasser ausgefällt, gut gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat liefert bei der Konzentration Histidinmonochlorhydrat. Ausbeute: 10 *l* Blut liefern 70—90 *g* Histidinmonochlorhydrat.

Histidin.[2])

Das Histidin (β-Imidazolalanin) kristallisiert in tafelförmigen Kristallen, die in Wasser leicht löslich sind, schwer löslich in Alkohol. Die wässerige Lösung reagiert alkalisch.

$C_6H_9N_3O_2$. MG = 155·10. l.M. = 19061.[3])
46·45% C. 5·81% H. 27·10% N.

Es verbindet sich mit 1 und 2 Molekülen Säure.

Histidinmonochlorhydrat: $C_6H_9N_3O_2 . HCl + H_2O$.
MG = 209·58. l.M. = 32135.
34·37% C. 5·72% H. 20·05% N. 16·94% Cl. 8·59% H_2O.

Das Kristallwasser entweicht bei 135° unter schwacher Braunfärbung der Substanz. Diese Verbindung kristallisiert gewöhnlich aus; hat man einen Überschuß von Salzsäure in Lösung, so erhält man:

---

[1]) *H. Pauly*, Über die Konstitution des Histidins. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **42**. S. 514 (1904). — *Fr. Knoop*, Abbau und Konstitution des Histidins. Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie. Bd. **10**. S. 115 (1907).

[2]) Beschreibung des Histidins und seiner Salze: *A. Kossel*, Über die basischen Stoffe des Zellkerns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **22**. S. 182 (1896). — *S. Hedin*, Zur Kenntnis der Spaltungsprodukte der Proteinkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **22**. S. 191 (1896). — *Fr. Kutscher*, Über Histidindichlorid. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **28**. S. 383 (1899). — *A. Kossel*, Über das optische Drehungsvermögen des Histidins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **28**. S. 382 (1899). — *H. Steudel*, Das Verhalten der Hexonbasen zur Pikrolonsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **37**. S. 219 (1903) und Bd. **44**. S. 157 (1905).

[3]) Die Molekulargewichte usw. sind unter Zugrundelegung der logarithmischen Rechentafeln für Chemiker von *F. W. Küster* (7. Aufl. 1907. Leipzig. Veit & Co.) berechnet.

Histidindichlorhydrat: $C_6H_9N_3O_2 . 2HCl$.

MG = 228. 1M = 35793.

31·58% C. 4·82% H. 18·42% N. 31·14% Cl.

Es sintert bei 225° und schmilzt bei 231—233°.

Die freie Base dreht nach links $[\alpha]_D = -39·74°$, die salzsaure Lösung nach rechts, und zwar nimmt die Drehung mit der Menge der Salzsäure zu.

Das Histidin bildet mit Salpetersäure, mit Platinchlorid und mit Silbernitrat gut kristallisierende Doppelsalze.

Versetzt man eine Lösung von Histidin mit Silbernitrat und dann vorsichtig mit Ammoniak, Natronlauge oder Barytwasser, so erhält man einen weißen, gelatinösen Niederschlag, der im Überschuß von Ammoniak leicht löslich ist und folgende Zusammensetzung hat:

$C_6H_7Ag_2N_3O_2 . H_2O$. MG = 387. 1.M. = 58771.

18·60% C. 2·33% H. 55·81% Ag.

Das Histidin gibt mit Diazobenzolsulfosäure in sodaalkalischer Lösung intensive (dunkelkirschrote) Diazoreaktion, mit Bromwasser beim Erwärmen rötliche bis dunkelweinrote Färbung.[1])

Zur Identifizierung des Histidins dient das Pikrolonat:

$C_{10}H_8N_4O_5 . C_6H_9N_3O_2$. MG = 419·20. 1M. = 62242.

45·80% C. 4·09% H. 23·44% N (gelbe Nadeln), in Wasser schwer löslich.

F. P. = 225°.

Arginin (Guanidin-α-Aminovaleriansäure).[2])

Das bei der Hydrolyse von Eiweißkörpern gewonnene Arginin ist gewöhnlich rechtsdrehend, es kristallisiert in rosettenförmigen Drusen von prismatischen Nadeln, reagiert stark alkalisch und zieht begierig Kohlensäure an, die beim Verdampfen der Lösung wieder entweicht. F. P. = 207°. Leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol.

---

[1]) *Fr. Knoop*, Eine Farbenreaktion des Histidins. Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie. Bd. **11**. S. 336 (1908).

[2]) Beschreibung des Arginins und seiner Salze: *E. Schulze* und *E. Steiger*, Über das Arginin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **11**. S. 43 (1886). — *S. G. Hedin*, Über ein neues Spaltungsprodukt der Hornsubstanz. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **20**. S. 186 (1895). — *S. G. Hedin*, Über die Bildung von Arginin aus Proteinkörpern. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **21**. S. 155 (1895). — *W. Gulewitsch*, Über das Arginin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **27**. S. 178 (1899). — *W. Gulewitsch*, Nachtrag zu meiner Mitteilung über das Arginin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **27**. S. 368 (1899). — *D. Lawrow*, Über Benzoylierung der Hexonbasen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **28**. S. 585 (1899). — *H. Steudel*, Das Verhalten der Hexonbasen zur Pikrolonsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **37**. S. 319 (1903) und Bd. **44**. S. 157 (1905). — *O. Riesser*, Zur Kenntnis der optischen Isomeren des Arginins und Ornithins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. B. **49**. S. 211 (1906). — *Fr. Kutscher*, Die Überführung des rechtsdrehenden Arginins in die optisch inaktive Modifikation. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **32**. S. 476 (1901). — *E. Schulze*, Einige Bemerkungen über das Arginin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **29**. S. 329 (1900).

Lösungen von freiem Arginin liefern, an der Luft eingeengt, Kristallisationen von Argininkarbonat.

Neutrales Argininnitrat, $C_6H_{14}N_4O_2HNO_3 + 1/2H_2O$, leicht löslich in Wasser, wird zur Reinigung am besten aus heißem verdünntem (85%igen) Alkohol umkristallisiert.

Verliert bei 110° 3·66% H_2O.

Berechnet für $C_6H_{16}N_5O_{5.5}$ MG = 246. l.M.G = 39094.

29·27% C. 6·50% H. 28·45% N.

F.P. = 175°, wenn vorher längere Zeit bei 85° getrocknet.

Saures Argininnitrat, $C_6H_{14}N_4O_2 . 2HNO_3$, kristallisiert bei einem Überschuß von Salpetersäure beim Verdampfen im Vakuum.
F.P. = 144·5—145°. MG = 300. l. M. = 47712. 24·0% C. 5·33% H.
28·04% N.

Argininchlorhydrat. Rhomboederähnliche, in Wasser leicht lösliche Kristalle, in heißem 85%igem Alkohol schwerer löslich als in kaltem.

$C_6H_{14}N_4O_2 . HCl + H_2O$. 7·88% H_2O.

Das Kristallwasser entweicht bei 100°: $C_6H_{14}N_4O_2 . HCl$.
MG = 210·5. l. M. = 32325. 34·20% C. 7·13% H. 16·83% Cl.

Argininkupfernitrat: $Cu(NO_3)_2 + 2C_6H_{14}N_4O_2 + 3H_2O$.

F.P. = 112—114° wasserhaltig, 234° wasserfrei.

Argininkupfersulfat: $CuSO_4 + 2C_6H_{14}N_4O_2 + 5 1/2 H_2O$.

Pikrat: $C_6H_{14}N_4O_2 . C_6H_2(NO_2)_3OH$. F.P. = 205—206°.

Silbersalze: $AgNO_3 + C_6H_{14}N_4O_2 + 1/2 H_2O$;

$AgNO_3 + C_6H_{14}N_4O_2 . HNO_3$.

Zur Identifizierung des Arginins dient das Pikrolonat:

$C_{10}H_8N_4O_5 . C_6H_{14}N_4O_2 + H_2O$.

Das Kristallwasser entweicht bei 110°. Für $C_{10}H_8N_4O_5 . C_6H_{14}N_4O_2$. MG=438·2. l.M.=64167. 43·82% C. 5·06% H. 25·62% N (gelbe Nadeln). Löslichkeit in kaltem Wasser bei Zimmertemperatur 1:1124, in 96%igem Alkohol 1:2885. F.P. = 225° (unkorr.).[1])

Durch Silbernitrat allein wird das Arginin nicht gefällt, wohl aber fällt nach Zusatz von Natronlauge oder Barytwasser die Silberverbindung als voluminöser amorpher Niederschlag aus, im Überschuß von Barytwasser unlöslich.

Mit Benzoylchlorid entsteht Dibenzoylarginin, $C_6H_{12}(C_6H_5 . CO)_2N_4O_2$. 62·78% C. 5·80% H. 14·69% N. F.P. = 217—218°. Mit β-Naphtalinsulfochlorid β-Naphtalinsulfoarginin $C_6H_{14}N_4O_2 . SO_2H_7C_{10}$. 52·75% C. 5·49% H. 8·79% S.

Das Arginin, aus der Hydrolyse von Eiweiß mit Mineralsäure gewonnen, ist rechtsdrehend (z. B. das HCl-Salz in 10%iger Lösung $[\alpha]_D = 10·70°$), durch Racemisierung erhält man das inaktive Arginin[2]),

[1]) Der von *Riesser* angegebene Schmelzpunkt ist nicht richtig. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **49**. S. 220. Siehe dazu auch *F. Weiß*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **52**. S. 114.

[2]) *F. Kutscher*, Die Überführung des rechtsdrehenden Arginins in die optisch inaktive Modifikation. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **32**. S. 476 (1901).

aus dem das l-Arginin[1]) erhalten werden kann, wenn man z. B. Leberpreßsaft darauf einwirken läßt, der das d-Arginin zersetzt vermöge seines Gehaltes an Arginase.

Lysin (α, ε-Diaminocapronsäure).[2])

Es wird gewöhnlich als rechtsdrehendes Lysin gewonnen, durch Racemisierung und durch Synthese kann man inaktives Lysin erhalten.

Die freie Base kristallisiert nicht.

Lysinchlorhydrat: $C_6 H_{14} N_2 O_2 . 2 HCl$, verliert leicht 1 Mol. HCl beim Umkristallisieren aus Lösungen, die keine Salzsäure enthalten.

F. P. = 192—193°. Leicht in Wasser löslich, schwer löslich in Alkohol.

32·86% C. 7·31% H. 32·42% Cl.

Spezifische Drehung für 2—5%ige Lösungen $[\alpha]_D = + 14—15·3°$.

Lysinplatinchlorid: $C_6 H_{14} N_2 O_2 . 2 HCl . PtCl_4 + C_2 H_6 O$, gelbrote Prismen aus alkoholischer Lösung:

15·99% C. 3·66% H. 4·66% N. 32·35% Pt. 35·34% Cl.

Lysinpikrat: $C_6 H_{14} N_2 O_2 : C_6 H_2 (NO_3)_2 OH$, gelbe Nadeln, ziemlich schwer in Wasser löslich, löslich im Überschuß von Pikrinsäure.

38·40% C. 4·53% H. 18·67% N.

Zur Identifizierung ist das Pikrat am besten geeignet.

Das Karbonat, Nitrat, Sulfat kristallisiert gleichfalls.

Lysin wird im Gegensatz zu Histidin und Arginin nicht durch Silbernitrat und Baryt respektive Ammoniak gefällt; es bildet mit Silbernitrat 2 Salze, die den Argininsalzen entsprechen und in Wasser ziemlich leicht löslich sind ($C_6 H_{14} N_2 O_2 . AgNO_3$ und $AgNO_3 + C_6 H_{14} N_2 O_2 . HNO_3$).

Mit Phenylisocyanat entsteht ein Hydantoin $C_{20} H_{22} N_4 O_3$.

F. P. = 183—184°. 65·57% C. 6·01% H. 15·30% N.

Mit alkoholischer Pikrolonsäure liefert Lysin in wässeriger Lösung kein schwer lösliches Salz.

Ornithin (α-δ-Diaminovaleriansäure).[3])

Das gewöhnliche Ornithin ist rechtsdrehend, die freie Base kristallisiert nicht, ihre Salze sind in Wasser meist leicht löslich, in Alkohol schwer

[1]) *O. Riesser*, Zur Kenntnis der optischen Isomeren des Arginins und Ornithins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **49**. S. 211 (1906).

[2]) Beschreibung des Lysins und seiner Salze: *E. Drechsel*, Der Abbau der Eiweißstoffe: Zur Kenntnis der Spaltungsprodukte des Kaseins. Archiv für Anatomie und Physiologie. S. 254 (1891). — *E. Drechsel* und *Th. R. Krüger*, Zur Kenntnis des Lysins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **25**. S. 2454 (1892). — *S. G. Hedin*, Eine Methode, das Lysin zu isolieren, nebst einigen Bemerkungen über das Lysatinin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **21**. S. 297 (1895). — *A. Kossel*, Über die Darstellung und den Nachweis des Lysins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **26**. S. 586 (1899). — *O. Herzog*, Über den Nachweis von Lysin und Ornithin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **34**. S. 525 (1902). — *Y. Henderson*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Hexonbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 320 (1900).

[3]) Beschreibung des Ornithins und seiner Salze: *M. Jaffé*, Über das Verhalten der Benzoesäure im Organismus der Vögel. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **10**. S. 1926

löslich. Das Ornithin entsteht aus Arginin durch Sieden mit Barytwasser[1]) oder durch Einwirkung von Arginase.[2])

Zur Identifizierung dient das Nitrat $C_5H_{12}N_2O_2 . HNO_3$, die Dibenzoylverbindung $C_{19}H_{20}N_2O_4$, F. P. = 184°, oder das Hydantoin der Phenylisocyanatverbindung[3]) $C_{19}H_{20}N_4O_3$. F. P. = 191—192°.

Salze des inaktiven Ornithins[4]):

dl-Ornithinnitrat: $C_5H_{12}N_2O_2\,HNO_3$. F. P. 183°. 30·77% C. 6·66% H. 21·54% N.

dl-Ornithinchlorhydrat: $C_5H_{12}N_2O_2\,HCl$. F. P. 215°. 16·62% N.

dl-Ornithinoxalat: $(C_5H_{12}N_2O_2)_2(COOH)_2$. F. P. 218°. 40·67% C. 7·34% H. 15·82% N.

dl-Ornithinmonopikrat: $C_5H_{12}N_2O_2 . C_6H_3N_3O_7$. F. P. 195°. 19·39% N.

dl-Ornithinpikrolonat: $C_5H_{12}N_2O_2 . C_{10}H_8N_4O_5 + 1^1/_2 H_2O$. F. P. 220 bis 221°. 6·38% H_2O. $C_5H_{12}N_2O_2 . C_{10}H_8N_4O_5$. 45·45% C. 5·05% H, 21·21% N.

dl-Ornithinacetat: $C_5H_{12}N_2O_2 . C_2H_4O_2$. 14·58% N.

dl-Ornithinkupfersulfat: $(C_5H_{12}N_2O_2)_2CuSO_4 + H_2O$. F. P. 204—205°. 4·07% H_2O. Wasserfrei 14·99% Cu.

dl-Ornithinkupfernitrat: $(C_5H_{12}N_2O_2)_2Cu(NO_3)_2 + {}^1/_2 H_2O$. F. P. 167°. 1·95% H_2O. H_2O-frei 14·06% Cu.

dl-Ornithinsilbernitrat: $C_5H_{12}N_2O_2\,HNO_3 + AgNO_3$. F. P. 175°. 29·60% Ag.

Guanidin.

Zur Identifizierung des Guanidins dient das Pikrat:

$$CN_3H_5 . C_6H_2(NO_2)_3OH \quad (F. P. = 315°)$$

oder das Pikrolonat $CN_3H_5 . C_{10}H_8N_4O_5$[5]) (F. P. = 272—274°).

(1877). — Derselbe, Weitere Mitteilungen über die Ornithursäure und ihre Derivate. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **11**. S. 406 (1878). — *M. Jaffé* und *R. Cohn*, Über das Verhalten des Furfurols im Stoffwechsel der Hühner. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 3464 (1888).

[1]) *E. Schulze* und *E. Winterstein*, Über die Bildung von Ornithin bei der Spaltung des Arginins und über die Konstitution dieser beiden Basen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **26**. S. 1 (1898). — Dieselben, Über die Konstitution des Arginins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **31**. S. 3191 (1899).

[2]) *A. Kossel* und *H. D. Dakin*, Über die Arginase. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **41**. S. 321 (1904). — Weitere Untersuchungen über fermentative Harnstoffbildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 181 (1904). — *A. Kossel* und *Fr. Weiss*, Über die Einwirkung von Alkalien auf Proteïnstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 313 (1909).

[3]) *O. Herzog*, Über den Nachweis von Lysin und Ornithin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **34**. S. 525 (1902).

[4]) *Fr. Weiss*, Über einige Salze des inaktiven Ornithins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **59**. S. 499 (1909).

[5]) *M. Schenck*, Über das Guanidinpikrolonat. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44**. S. 427 (1905).

ANHANG.

a) Isolierung von Aminosäuren, von Asparagin und Glutamin aus Pflanzen.

A. Über die Vorbereitung der Pflanzen für die Untersuchung und über die Darstellung der Extrakte.

Von **E. Schulze** und **E. Winterstein**, Zürich.

Die Zerkleinerung von trockenen Pflanzen und Pflanzenteilen kann mittelst einer Mühle geschehen. In ein staubfeines Pulver können die meisten Substanzen mit Hilfe der nach Angaben *M. Maerckers* vom Mechaniker Dreefs in Halle konstruierten Reibe verwandelt werden. Um dieses Ziel vollständig zu erreichen, muß man aber aus dem bei der ersten Zerkleinerung erhaltenen Pulver die feinsten Partikelchen absieben, die auf dem Sieb gebliebenen gröberen Teile wieder auf die Reibe bringen und diese Operation eventuell noch mehrmals wiederholen. Das Zerreiben der pflanzlichen Substanzen gelingt leichter, wenn man dieselben zuvor unter Anwendung einer erhöhten Temperatur getrocknet hat. Fettreiche Pflanzenteile, z. B. fettreiche Samen, lassen sich in ein feines Pulver erst verwandeln, nachdem sie vom größten Teil des Fettes befreit worden sind; letzteres läßt sich durch Behandlung des gröblich zerkleinerten Materials mit Äther oder Petroläther erreichen.

Frische Pflanzen oder Pflanzenteile werden, je nach ihrer Beschaffenheit, mit Hilfe einer Mühle oder in einem Mörser zerkleinert. Das Zerreiben im Mörser kann durch Zusatz von reinem Sand erleichtert werden.

Bei Darstellung wässeriger Extrakte aus frischen oder getrockneten Pflanzen oder Pflanzenteilen ist das Gemisch der zu extrahierenden Substanzen mit dem Wasser auf mindestens 50° C zu erwärmen, falls nicht besondere Gründe das Einhalten einer niedrigeren Temperatur wünschenswert machen. Bei stärkemehlfreien oder an Stärkemehl sehr armen Substanzen kann man stärker erwärmen und unter Umständen die Temperatur bis auf den Siedepunkt des Wassers steigern. Längeres Kochen mit Wasser ist aber im allgemeinen zu vermeiden, da leicht zersetzliche Pflanzenbestandteile dabei eine Veränderung erleiden können. Auch darf man annehmen,

daß die Pflanzenbestandteile, auch wenn sie in reinem Zustande in Wasser schwer löslich sind, meistens bei einer Temperatur von 50° leicht in Lösung gehen. Denn ihre Auflösung wird durch das Vorhandensein anderer leicht löslicher Substanzen in der Regel sehr befördert. Das Gleiche gilt für die Extraktion mit Alkohol: Pflanzenbestandteile, die nach der Reindarstellung sich in Alkohol sehr wenig lösen, können aus den zerkleinerten Pflanzen durch kochenden 90—92%igen Alkohol meistens ohne Schwierigkeit in Lösung gebracht werden.

Bei Trennung der Extrakte von den Rückständen ist die Anwendung einer Presse zu empfehlen. Wenn die Extrakte trübe von der Presse abfließen, so ist dies mit einem Nachteil nicht verbunden, falls die Extrakte, wie es meistens geschieht, durch Versetzen mit Bleiacetat oder ähnlichen Fällungsmitteln einer Reinigung unterworfen werden.

Bekannt ist, daß man mit Hilfe einer stark wirkenden Presse aus frischen Pflanzen oder Pflanzenteilen ohne Schwierigkeit den Saft gewinnen kann.

Das Trocknen frischer Pflanzen geschieht am besten bei einer Temperatur von 60—70°. Bei Anwendung höherer Temperaturen ist größere Gefahr, daß leicht zersetzliche Pflanzenbestandteile eine Veränderung erleiden. Diese Gefahr wird zwar noch mehr verringert werden, wenn man das Trocknen bei einer Temperatur von ca. 40° vornimmt; doch ist es dann eher möglich, daß während des Trocknens eine Zersetzung gewisser Pflanzenbestandteile durch die neben ihnen sich vorfindenden Enzyme beginnt. Denn die angegebene Temperatur ist für die Wirkung der meisten Enzyme günstig; auch geht bei derselben selbstverständlich das Trocknen nur langsam vor sich.

Ein rationelles Verfahren zur Entwässerung frischer Pflanzen besteht darin, daß man letztere in 95%igem oder in absolutem Alkohol bringt und sie darin einige Wochen lang beläßt. Nach dem Abgießen der weingeistigen Extrakte lassen sich die vom größten Teile des Vegetationswassers befreiten Pflanzen in gelinder Wärme, zuweilen schon bei gewöhnlicher Temperatur im Exsikkator ohne Schwierigkeit trocknen. Es ist anzunehmen, daß nach dem Einbringen in den Alkohol die Lebenstätigkeit in den Pflanzen sehr bald erlischt und daß die Entwässerung ohne Zersetzung von Pflanzenbestandteilen erfolgt. Selbstverständlich aber muß man bei der Untersuchung neben den getrockneten Pflanzen auch die Bestandteile der weingeistigen Extrakte berücksichtigen. In diese Extrakte geht meistens ein ansehnlicher Teil der löslichen Pflanzenbestandteile über, da der Alkohol durch das Vegetationswasser der Pflanzen verdünnt wird.

B. Darstellung von Asparagin und Glutamin.

Die Darstellung von Asparagin aus etiolierten Keimpflanzen, Kartoffelsaft und anderen asparaginreichen Objekten gelingt sehr leicht, da dieses Amid in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich ist (ein Teil bedarf zur Lösung

47 Teile Wasser von 20°) und ferner die Eigenschaft hat, auch aus Extrakten, welche viele Nebenbestandteile enthalten, sich in gut ausgebildeten Kristallen abzuscheiden. Man kann die asparaginhaltigen Säfte und Extrakte, nachdem sie durch Erhitzen von den koagulierbaren Eiweißstoffen befreit worden sind, direkt zur Sirupskonsistenz eindunsten: nach einiger Zeit beginnt dann die Ausscheidung von Asparaginkristallen. Letztere lassen sich in der Regel leicht von der Mutterlauge trennen und durch Umkristallisieren reinigen. Man kann aber auch die Säfte und Extrakte mit Bleiessig versetzen, die von den Bleiniederschlägen abfiltrierten Flüssigkeiten sodann mittelst Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreien, sie hierauf mit Natronlauge neutralisieren und nun zur Sirupskonsistenz eindunsten; auch dann erhält man Asparaginkristalle.

Hat man es mit asparaginarmen Objekten zu tun, so empfiehlt sich die Ausfällung des genannten Amids durch Mercurinitrat. Man versetzt den Saft oder Extrakt mit Bleiessig in schwachem Überschuß, entfernt den Bleiniederschlag durch Filtration und fügt dem Filtrat Mercurinitrat zu (man verwendet dazu eine durch Behandlung des käuflichen Mercurinitrats mit Wasser unter Zusatz von etwas Salpetersäure hergestellte Lösung). Man kann die Ausfällung des Asparagins vollständiger machen, indem man die Azidität der Flüssigkeit durch Zusatz von etwas Natronlauge abstumpft. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, zwischen Fließpapier abgepreßt, dann in Wasser verteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Man neutralisiert das Filtrat vom Quecksilbersulfid mit Ammoniak und dunstet es sodann in gelinder Wärme zum Sirup ein (während des Eindunstens fügt man von Zeit zu Zeit etwas Ammoniak zu, um die Flüssigkeit neutral zu erhalten). Der Sirup liefert beim Stehen Asparaginkristalle, letztere können durch Tyrosin, Vernin oder Allantoin verunreinigt sein, falls diese Substanzen neben Asparaginen in den Extrakten sich vorfanden. Tyrosin und Vernin lassen sich wegen ihrer Schwerlöslichkeit ziemlich leicht vom Asparagin trennen; die Trennung des Asparagins vom Allantoin läßt sich am besten durch Überführung in das in Wasser sehr schwer lösliche Asparaginkupfer bewerkstelligen. In jedem Falle müssen die Asparaginkristalle durch Umkristallisieren gereinigt werden.

Die Asparaginkristalle sind leicht zu identifizieren. Beim Erhitzen auf 100° werden sie weiß und undurchsichtig und verlieren 12% an Gewicht. Beim Kochen mit verdünnter Natronlauge entwickeln sie Ammoniak. Aber auch beim Erhitzen mit stark verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure werden sie unter Ammoniakbildung zersetzt. Dies läßt sich nachweisen, indem man die mit verdünnter Säure erhitzte Lösung nach dem Abkühlen mit Natronlauge neutralisiert und sodann *Neßler*sches Reagenz zusetzt. Eine wässerige Asparaginlösung löst in der Wärme Kupferhydroxyd. Aus der tiefblauen Flüssigkeit scheidet sich beim Erkalten kristallinisches Asparaginkupfer ab. Diese Verbindung läßt sich auch durch Erhitzen der Asparaginlösung mit Kupferacetat erhalten.

Das Asparagin läßt sich auch mikrochemisch nachweisen. Wenn man asparaginhaltige Pflanzenteile in Alkohol legt, so scheiden sich in den Zellen

Asparaginkristalle ab, die an ihrem Aussehen und an einigen anderen Eigenschaften erkannt werden können.

Obwohl das Glutamin ziemlich schwer löslich in kaltem Wasser ist (1 Teil bedarf bei Zimmertemperatur 25 Teile Wasser zur Lösung), so gelingt es doch nicht, dieses Amid durch Kristallisation aus den zur Sirupkonsistenz eingedunsteten Pflanzensäften direkt zu gewinnen; man kann es aber leicht mit Hilfe von Mercurinitrat zur Abscheidung bringen. Man verfährt dabei ganz ebenso, wie es oben für das Asparagin angegeben ist. Da das Glutamin beim Kochen mit Wasser leichter zersetzt wird als das Asparagin, so empfiehlt es sich, die glutaminhaltigen Lösungen, die man bei Zerlegung der Mercurinitratniederschläge erhält, in gelinder Wärme einzudunsten. Man befreit die aus diesen Lösungen erhaltenen Glutaminkristalle mit Hilfe einer Tonplatte von der Mutterlauge und reinigt sie sodann durch Umkristallisieren aus warmem Wasser. Beim letzten Umkristallisieren kann man, um die Ausscheidung des Glutamins zu befördern, der Lösung Alkohol zusetzen.

Das Glutamin läßt sich sehr leicht vom Asparagin unterscheiden, da es im Gegensatz zu diesem in feinen, weißen Nadeln ohne Kristallwasser kristallisiert. Im übrigen gibt es die gleichen Reaktionen wie das Asparagin. Das in Wasser sehr schwer lösliche Glutaminkupfer, $(C_5 H_9 N_2 O_3)_2 Cu$, hat eine blauviolette Farbe. Zum sicheren Nachweis des Glutamins kann man das freie Glutamin oder das Glutaminkupfer der Analyse unterwerfen. Auch die Überführung des Glutamins in Glutaminsäure, $C_4 H_9 NO_4$, kann dem gleichen Zwecke dienen. Wenn man das Glutamin bis zum Aufhören der Ammoniakentwicklung mit Barytwasser kocht, die Flüssigkeit sodann mit Hilfe von Schwefelsäure vom Baryt befreit und nun stark einengt, so scheiden sich bald Kristalle von Glutaminsäure aus.

Hin und wieder treten Asparagin und Glutamin nebeneinander in einer Pflanze auf. Die bei Zerlegung des Merkurinitratniederschlags erhaltene Lösung liefert dann in der Regel zuerst Asparaginkristalle, während das leichter lösliche Glutamin sich erst später ausscheidet. Aus einem Gemenge von Asparagin- und Glutaminkristallen kann man die letzteren durch Abschlemmen mit Hilfe der Mutterlauge bis zu einem gewissen Grade von den weit größeren Asparaginkristallen trennen. Daß in solchen Lösungen Mischkristalle entstehen, die zugleich Asparagin und Glutamin enthalten, ist bis jetzt nicht beobachtet worden.

Quantitative Bestimmung des Asparagins und des Glutamins.

R. Sachsses[1]) Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Asparagins gründet sich auf die Tatsache, daß dieses Amid beim Kochen mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure unter Wasseraufnahme nach der Gleichung

[1]) Journal für praktische Chemie. [2.] Bd. **6**. S. 118. — Man vgl. auch die Abhandlung von *E. Schulze*. Ebenda. [2.] Bd. **31**. S. 233.

$$C_2H_3NH_2\langle{}^{CONH_2}_{COOH} + H_2O = C_2H_3NH_2\langle{}^{COOH}_{COOH} + NH_3$$

in Asparaginsäure und Ammoniak zerfällt, wobei 132 Teile wasserfreies Asparagin 17 Teile Ammoniak liefern. Das Verfahren läßt sich auch zur Bestimmung des Glutamins verwenden, da dieses Amid bei gleicher Behandlung in Glutaminsäure und Ammoniak zerfällt, nach der Gleichung

$$C_3H_5NH_2\langle{}^{CONH_2}_{COOH} + H_2O = C_3H_5NH_2\langle{}^{COOH}_{COOH} + NH_3.$$

wobei 146 Teile Glutamin 17 Teile Ammoniak liefern.

Bei Ausführung des Verfahrens setzt man dem asparagin- oder glutaminhaltigen Extrakt pro 100 cm^3 8—10 cm^3 konzentrierte Salzsäure oder $2^1/_2$—3 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure zu und kocht sodann ca. 2 Stunden lang am Rückflußkühler. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mit Natronlauge annähernd neutralisiert und hierauf unter Zusatz von Magnesia der Destillation unterworfen; das übergehende Ammoniak fängt man in titrierter Säure auf. Es ist zweckmäßig, das Austreiben des Ammoniaks durch Einleiten von ammoniakfreier Luft zu befördern oder die Destillation mit Magnesia im Vakuum vorzunehmen. Bei Berechnung des Asparagin- oder Glutamingehalts des Extrakts muß man selbstverständlich das vor dem Erhitzen mit Säure schon vorhandene Ammoniak, dessen Bestimmung weiter unten besprochen werden soll, in Abrechnung bringen.

Die für die Bestimmung zu verwendenden asparagin- und glutaminhaltigen Extrakte müssen von anderen, beim Erhitzen mit verdünnten Säuren ammoniakliefernden Substanzen so vollständig wie möglich befreit werden. Proteinstoffe kann man durch Zusatz von reinem Tannin entfernen; um die dadurch erzeugten Niederschläge besser abfiltrieren zu können, fügt man einige Tropfen Bleiacetat zu. Man kann zur Ausfällung der Proteinstoffe auch Phosphorwolframsäure verwenden; das Filtrat muß dann vor dem Erhitzen mit Säure von dem genannten Reagenz befreit werden, was durch Zusatz von Bleiacetat geschehen kann. Eine beim Kochen mit Säuren ammoniakliefernde Verbindung, die sich aus den Extrakten nicht entfernen läßt, ist das Allantoin; findet sich dasselbe neben Asparagin oder Glutamin in den Extrakten vor, so bedingt dies einen Fehler bei Ausführung der Bestimmungen. Da es möglich ist, daß manche Extrakte noch andere, bisher nicht isolierte Stickstoffverbindungen von gleichem Verhalten einschließen, so kann das beschriebene Verfahren eigentlich nur als eine Methode zur Bestimmung der aus Amiden abspaltbaren Ammoniakmenge bezeichnet werden. Nur unter gewissen Voraussetzungen läßt sich aus dem Ergebnis die im Extrakt enthaltene Asparagin- oder Glutaminquantität genau berechnen. Finden sich Asparagin und Glutamin nebeneinander vor, so kann man, wie kaum gesagt zu werden braucht, den Gesamtgehalt des Extrakts an diesen beiden Amiden nur appro-

ximativ berechnen. In der Regel findet sich aber bei gleichzeitigem Vorhandensein der beiden Amide das eine, entweder das Asparagin oder das Glutamin nur in sehr kleiner Menge vor; nur selten hat man beobachtet, daß beide nebeneinander in ansehnlicher Quantität auftreten.

Die Darstellung der für diese Bestimmungen zu verwendenden Extrakte muß in solcher Weise geschehen, daß dabei eine Zersetzung von Asparagin und Glutamin so vollständig wie möglich vermieden wird. Frischen Pflanzen oder Pflanzenteilen fügt man, nachdem sie zerrieben worden sind, etwas Wasser zu und erwärmt dann eine halbe Stunde lang auf mindestens 50° C; getrocknete Pflanzen werden unter Hinzufügen einer etwas größeren Wasserquantität in der gleichen Weise behandelt. Bei stärkemehlfreiem oder an Stärkemehl sehr armen Objekten kann man die Flüssigkeit kurze Zeit bis zum Siedepunkt erhitzen; längeres Kochen ist wegen der Leichtzersetzlichkeit des Glutamins zu vermeiden. Reagieren die Extrakte stark sauer, so fügt man Alkali zu, bis die Reaktion fast neutral geworden ist. Als Extraktionsmittel statt des Wassers stark verdünnten Weingeist anzuwenden, scheint keinen Vorteil darzubieten.

Bestimmung des Ammoniakgehalts der nicht mit Säure erhitzten Extrakte.

Man unterwirft den Extrakt unter Zusatz von Magnesia der Destillation im Vakuum bei einer Temperatur von ca. 40° und fängt das übergehende Ammoniak in titrierter Schwefelsäure auf. Man kann sich dabei des durch eine Skizze auf S. 527 veranschaulichten Apparates bedienen.

C. Darstellung von Aminosäuren aus Pflanzen.

Es ist nur selten möglich, aus den stark eingeengten Pflanzensäften Monoaminosäuren durch Kristallisation direkt zu gewinnen; am leichtesten gelingt dies noch beim Tyrosin. Besser ist es, für die Darstellung dieser Stoffe weingeistige Pflanzenextrakte zu verwenden. Man extrahiert die getrockneten, fein zerriebenen Pflanzen und Pflanzenteile mehrmals mit kochendem 90—92%igem Alkohol. Der Extrakt wird der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand mit Wasser behandelt, die trübe Flüssigkeit mit Bleiessig versetzt. Der durch dieses Reagenz entstandene Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat mittelst Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und sodann zum Sirup eingedunstet. Enthält die Flüssigkeit Monoaminosäuren in nicht zu geringer Menge, so erhält man eine aus solchen Stoffen bestehende Ausscheidung, die häufig schon während des Eindunstens eintritt und dann meistens eine Haut auf der Oberfläche der Flüssigkeit bildet. Man bringt sie nach Verlauf von einigen Tagen zur Entfernung der dickflüssigen Mutterlauge auf eine Tonplatte und trocknet sie sodann im Exsikkator.

Das in dieser Weise gewonnene Rohprodukt kann Tyrosin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Valin und einige andere Monoaminosäuren enthalten, schließt aber hin und wieder auch Asparagin in kleiner Menge ein. Die genannten Stoffe sind zwar in reinem Zustande wenig löslich in Alkohol, lösen sich aber, wenn sie im Gemenge mit anderen Pflanzenbestandteilen sich vorfinden, in kochendem 90—92%igem Weingeist ziemlich leicht auf; dies gilt selbst für das Tyrosin, welches in reinem Zustande sich gar nicht in Alkohol löst.

Nachdem dieses Rohprodukt zerrieben worden ist, übergießt man es mit Alkohol, erhitzt letzteren bis fast zum Sieden und fügt dann konzentrierte Ammoniakflüssigkeit in kleinen Anteilen zu. Die Monoaminosäuren lösen sich in dem heißen Gemisch von Alkohol und Ammoniakflüssigkeit teils leichter, teils schwieriger; am schwersten löst sich darin das Tyrosin. Letzteres bleibt daher größtenteils zurück, wenn man das genannte Gemisch nicht in großem Überschuß anwendet und das Erhitzen nicht zu lange fortsetzt; das gleiche gilt auch für etwa beigemengtes Asparagin. Man trennt die weingeistige Lösung von dem aus den genannten Stoffen bestehenden Rückstande und überläßt sie in einem Becherglase unter einer Glasglocke über konzentrierter Schwefelsäure der Verdunstung, wobei die in Lösung gegangenen Aminosäuren sich langsam in Kristallen abscheiden; diese Kristalle sind meistens farblos; sie werden, falls es nötig erscheint, unter Verwendung des gleichen Lösungsmittels noch einmal umkristallisiert.

Wie man das auf diesem Wege erhaltene Aminosäurengemenge weiter zu behandeln hat, das hängt von der Beschaffenheit der darin sich vorfindenden Stoffe ab. Besteht das Gemenge, wie es hin und wieder der Fall ist, vorzugsweise aus Phenylalanin und Valin, so erhitzt man seine wässerige Lösung mit Kupferhydroxyd. Der dabei zum Teil schon in der Wärme, vollständiger beim Erkalten entstehende kristallinische Niederschlag besteht vorzugsweise aus der Kupferverbindung des Phenylalanins, während die davon abfiltrierte tiefblaue Lösung vorzugsweise Valinkupfer enthält; diese Lösung liefert erst nach starkem Einengen eine kristallinische Ausscheidung. Das Phenylalanin läßt sich reinigen, indem man seine Kupferverbindung mittelst Schwefelwasserstoff zerlegt und die vom Schwefelkupfer abfiltrierte Lösung, nachdem sie stark eingeengt worden ist, mit Kupferacetat erhitzt, wobei reineres Phenylalaninkupfer sich ausscheidet. Enthält das Aminosäurengemenge auch Leucin in größerer Quantität, so kann man auf dem angegebenen Wege das Phenylalanin meistens nicht rein gewinnen. Valin läßt sich vom Leucin trennen, indem man beide Stoffe in Kupferverbindungen verwandelt und letztere mit Methylalkohol behandelt, worin Leucinkupfer unlöslich ist, während Valinkupfer sich löst. Doch kann man auf diesem Wege das Valin nicht vom Isoleucin trennen, da die Kupferverbindung des letzteren sich ebenfalls in Methylalkohol löst. Ein Gehalt jenes Gemenges an Tyrosin läßt sich wegen der Schwerlöslichkeit dieser Aminosäure in Wasser sowie in Eis-

essig leicht erkennen; selbstverständlich können zu diesem Zweck auch die bekannten Tyrosinreaktionen dienen.

Wenn man das in der beschriebenen Weise erhaltene Gemenge von Aminosäuren in genügender Quantität zur Verfügung hat, so empfiehlt es sich, nach der von *E. Fischer* gegebenen Vorschrift die Aminosäuren in Ester zu verwandeln und letztere der fraktionierten Destillation im Vakuum zu unterwerfen. Wie man dabei zu verfahren hat, braucht hier nicht näher angegeben zu werden; es kann auf die an anderer Stelle gemachten Angaben verwiesen werden. (Vgl. S. 470 ff.) Auch die Mittel, deren man sich zur Identifizierung der einzelnen Aminosäuren bedient, brauchen hier nicht besprochen zu werden.

Wenn die weingeistigen Pflanzenextrakte neben Aminosäuren Kohlenhydrate in bedeutender Quantität enthalten, so gelingt es in der Regel nicht, aus den bei der Verarbeitung dieser Extrakte erhaltenen sirupösen Flüssigkeiten Aminosäuren durch Kristallisation zu gewinnen. Es empfiehlt sich in diesem Falle, die in jenen sirupösen Flüssigkeiten enthaltenen Aminosäuren unter Befolgung der von *E. Fischer* gegebenen Vorschrift in Ester zu verwandeln und letztere durch Destillation im Vakuum von den übrigen Extraktbestandteilen zu trennen.

Tyrosin läßt sich aus Pflanzensäften und wässerigen Pflanzenextrakten auch durch Fällung mit Merkurinitrat zur Abscheidung bringen. Man versetzt jene Flüssigkeiten mit Bleiessig in schwachem Überschuß, entfernt die dadurch hervorgebrachten Niederschläge und fügt den Filtraten Merkurinitrat zu. Die durch dieses Reagenz hervorgebrachten Fällungen können neben Asparagin, Glutamin, Arginin usw. auch Tyrosin einschließen. Wenn man diese Niederschläge mittelst Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber abfiltrierten Flüssigkeiten mit Ammoniak neutralisiert und sodann stark einengt, so scheidet sich das Tyrosin, falls seine Quantität nicht zu gering ist, in der Regel vor den anderen Bestandteilen der Lösung in feinen Kristallen aus. Doch geht in die in solcher Weise durch Merkurinitrat erhaltenen Niederschläge stets nur ein Teil des im Extrakt vorhandenen Tyrosins ein. Man kann mehr Tyrosin erhalten, wenn man der vom Merkurinitratniederschlage abfiltrierten Flüssigkeit noch etwas Merkurinitrat und hierauf Natronlauge bis zum Eintreten einer schwach alkalischen Reaktion zusetzt. Der in solcher Weise erhaltene Niederschlag wird dann zur Gewinnung des darin enthaltenen Tyrosins ganz ebenso behandelt, wie es oben für den zuerst dargestellten Niederschlag angegeben ist. Die zweite, unter Zusatz von Natronlauge erhaltene Fällung kann neben Tyrosin auch Leucin, unter Umständen auch noch andere Aminosäuren, einschließen.

Über die Anwendbarkeit des β-Naphtalinsulfochlorids zur Abscheidung von Aminosäuren aus Pflanzenextrakten läßt sich zurzeit ein bestimmtes Urteil nicht fällen, da darüber nur wenige Versuche gemacht worden sind.

Darstellung von Arginin, Lysin und Histidin.

Zur Darstellung dieser Basen aus Pflanzenextrakten verfährt man in folgender Weise: Der Extrakt wird mit Bleiessig in schwachem Überschusse versetzt, das Filtrat vom Bleiniederschlage bei neutraler oder schwach saurer Reaktion im Wasserbade stark eingeengt, dann mit Schwefelsäure stark angesäuert [1]), filtriert und nun mit einer konzentrierten Lösung von Phosphorwolframsäure vermischt. Der dadurch hervorgebrachte Niederschlag wird nach längerem Stehen mit Hilfe eines Filters oder einer Nutsche von der Flüssigkeit getrennt und mit 5%iger Schwefelsäure gut ausgewaschen.[2]) Dann übergießt man ihn mit Wasser und fügt unter Umrühren soviel zerriebenes Baryumhydroxyd zu, daß letzteres im Überschuß vorhanden ist, was sich daran erkennen läßt, daß im Filtrat beim Einleiten von Kohlensäure ein Niederschlag sich bildet. Ehe man die unlöslichen Baryumverbindungen abfiltriert, entfernt man das in der Flüssigkeit enthaltene Ammoniak. Dies darf nicht durch Erhitzen geschehen. Denn die in den Pflanzenextrakten durch Phosphorwolframsäure erzeugten Niederschläge enthalten fast immer auch Kali. Wollte man nun die beim Zerreiben der Niederschläge mit Baryumhydroxyd und Wasser erhaltene Masse erhitzen, so würde durch das bei Einwirkung des Baryts aus dem Niederschlage frei gemachte Kali das Arginin zersetzt werden. Man muß also das Ammoniak ohne Anwendung von Wärme austreiben. Dies kann durch längeres Durchblasen von Luft erreicht werden. Rascher gelangt man zum Ziele, wenn man das Gemisch des Niederschlags mit Wasser und Baryumhydroxyd in eine flache Glasschale bringt und es sodann mit einem, durch eine Turbine getriebenen Rührwerk behandelt, bis das Ammoniak abgedunstet ist; man beendigt diese Operation, wenn die Flüssigkeit nicht mehr nach Ammoniak riecht und wenn ein über ihr aufgehängtes feuchtes, rotes Lackmuspapier sich nicht mehr bläuet.

Nach dem Austreiben des Ammoniaks entfernt man die unlöslichen Baryumverbindungen durch Filtration. In das Filtrat wird zur Entfernung des darin noch enthaltenen Baryumhydroxyds Kohlensäure eingeleitet. Nach dem Abfiltrieren des Baryumkarbonats neutralisiert man die Flüssigkeit mit Salpetersäure und engt sie hierauf im Wasserbade stark ein; wenn sie während des Eindunstens wieder alkalisch wird, so setzt man noch ein wenig Salpetersäure zu.

Die in dieser Weise erhaltene Basenlösung gibt in der Regel mit Silbernitrat einen Niederschlag, der Alloxurbasen enthält. Aus dem Filtrat

---

[1]) Man kann soviel Schwefelsäure zusetzen, daß die Quantität der letzteren bis auf 5% gesteigert ist.

[2]) Es ist zweckmäßig, den Niederschlag nach dem Ablaufen des Filtrats in einer Schale mit 5%iger Schwefelsäure anzurühren und ihn dann wieder auf das Filter oder die Nutsche zu bringen.

fällt man unter Befolgung der von *Kossel* und *Kutscher*[1]) gegebenen Vorschrift durch Silbernitrat und Barytwasser zuerst das Histidin, dann das Arginin aus (da diese Vorschrift an anderer Stelle mitgeteilt worden ist, so brauchen hier nähere Angaben über dieselbe nicht gemacht zu werden).

Die „Histidinfraktion" des Niederschlags wird durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus der vom Schwefelsilber abfiltrierten Flüssigkeit sucht man durch Fällung mit Quecksilbersulfat nach der von *Kossel* und *Patten*[2]) gegebenen Vorschrift reines Histidin zu gewinnen. Dies gelingt nicht immer; die „Histidinfraktion" enthält häufig Nebenbestandteile, welche die Reindarstellung des Histidins sehr erschweren.

Die „Argininfraktion" des Niederschlags wird unter Zusatz von etwas Schwefelsäure durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Man befreit das Filtrat vom Schwefelsilber, nachdem es im Wasserbade eingeengt worden ist, mittelst Baryumhydroxyd von der Schwefelsäure, leitet in das Filtrat zur Entfernung des überschüssigen Baryts Kohlensäure ein und dunstet die Flüssigkeit sodann im Wasserbade auf ein geringes Volumen ein. Nachdem sie durch Filtration von dem während des Eindunstens ausgeschiedenen Baryumkarbonat befreit worden ist, neutralisiert man sie mit Salpetersäure und dunstet sie hierauf zum Sirup ein. Der Sirup liefert in der Regel bald Kristalle von Argininnitrat; häufig verwandelt er sich vollständig in eine Kristallmasse. Das Arginin kann durch Überführung in die schwerlösliche Verbindung mit Kupfernitrat gereinigt werden; man erhält diese Verbindung, indem man in die heiße wässerige Lösung des Nitrats Kupferkarbonat oder Hydroxyd einträgt. Bei der Identifizierung des Arginins stützt man sich, falls man nicht eine Analyse ausführen will, auf den Schmelzpunkt des Argininkupfernitrats (112—114°) und auf die Reaktionen des Argininnitrats.

Das Filtrat vom Arginin-Silberniederschlage, welches neben Lysin noch andere Basen, z. B. Cholin, Betain und Trigonellin, enthalten kann, wird durch Zusatz von etwas Salzsäure vom Silber befreit, dann mit Schwefelsäure neutralisiert und im Wasserbade stark eingeengt. Hierauf fügt man Schwefelsäure zu, bis der Gehalt davon etwa 5% beträgt, entfernt das Baryumsulfat durch Filtration und fügt nun eine konzentrierte Phosphorwolframsäurelösung zu. Der dadurch erzeugte Niederschlag wird abfiltriert, mit 5%iger Schwefelsäure gut ausgewaschen, dann durch Verreiben mit Baryumhydroxyd und Wasser zerlegt. Die von den unlöslichen Baryumverbindungen abfiltrierte Lösung wird mittelst Kohlensäure vom Baryt befreit, dann mit Salzsäure übersättigt und eingedunstet. Den Verdampfungsrückstand trocknet man im Vakuumexsikkator, dann behandelt man ihn zuerst mit kaltem, dann mit kochendem Alkohol. Die Chloride des Cholins, Betains und Trigonellins gehen in Lösung, während Lysinchlorid wenigstens zum größten

---

[1]) Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 31. S. 165 (1900).

[2]) Zur Analyse der Hexonbasen. Ebenda. Bd. 38. S. 39 (1903).

Teile zurückbleibt (ein Teil dieses Salzes kann in Lösung gehen). Die zuerst genannten Chloride können aus der weingeistigen Lösung durch Merkurichlorid gefällt werden (cf. den nachfolgenden Abschnitt), während Lysinchlorid in Lösung bleibt. Der größte Teil des Lysinchlorids wird sich in der Regel in dem bei der Behandlung mit Alkohol ungelöst gebliebenen Salzrückstand, der fast immer auch Chloralkalien enthält, vorfinden; man kann es daraus durch Methylalkohol ausziehen. Am zweckmäßigsten ist es wohl, den lysinhaltigen Salzrückstand in Wasser zu lösen, die Lösung mit der von den Quecksilberdoppelsalzen des Cholins, Betains und Trigonellins abfiltrierten Mutterlauge zu vereinigen und sodann das Lysin durch Merkurichlorid und Barytwasser auszufällen. Man zerlegt den dabei erhaltenen Niederschlag unter Zusatz von etwas Schwefelsäure durch Schwefelwasserstoff, fällt aus der vom Schwefelquecksilber abfiltrierten Lösung das Lysin wieder durch Phosphorwolframsäure, zerlegt den Niederschlag mittelst Baryumhydroxyd und führt das in Freiheit gesetzte Lysin in bekannter Weise in das leicht kristallisierende Pikrat über. Aus dem Pikrat kann man, durch Schütteln dieses Salzes mit Salzsäure und Äther, Lysinchlorid darstellen. Zur Identifizierung führt man dieses Salz in das leicht kristallisierende Chloroplatinat über, welches 35·05% Platin enthält.

Das Histidin läßt sich in manchen Fällen ohne Schwierigkeit gewinnen, indem man die bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages mittelst Baryumhydroxyds erhaltene Lösung, nachdem sie zuvor durch Einleiten von Kohlensäure vom Baryt befreit worden ist, mit einer wässerigen Merkurichloridlösung versetzt, die dadurch hervorgebrachte Fällung abfiltriert und sodann mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber durch Filtration getrennte Lösung liefert beim Eindunsten in der Regel Kristalle von Histidinchlorid. Zur Identifizierung des Histidins bestimmt man den Silbergehalt des nach bekanntem Verfahren dargestellten Histidinsilbers.

Das Arginin kann aus den Pflanzenextrakten, nachdem letztere von den durch Bleiessig fällbaren Stoffen befreit worden sind, durch Merkurinitrat partiell gefällt werden.[1]) In die Merkurinitratniederschläge gehen, wie aus den oben gemachten Angaben hervorgeht, auch Asparagin und Glutamin, außerdem noch manche andere Stoffe (Alloxurbasen, Vernin usw.) ein. Aus den bei Zerlegung dieser Niederschläge mittelst Schwefelwasserstoff erhaltenen Lösungen läßt sich in manchen Fällen Argininnitrat kristallisiert erhalten. Die Bedingungen für die Gewinnung dieses Salzes sind selbstverständlich nicht besonders günstig, wenn die bezüglichen Niederschläge reich an Asparagin oder Glutamin sind; doch kann man das Argininnitrat vom Asparagin ziemlich leicht trennen, weil es sich in heißem Weingeist leichter löst, als das genannte Amid. Immerhin ist es weit zweckmäßiger, zur Darstellung von Arginin den zuerst beschriebenen Weg

[1]) Ganz reines Argininnitrat wird durch Merkurinitrat nicht gefällt; gewisse Nebenbestandteile der Extrakte müssen also hier von Einfluß sein.

(Ausfällung durch Phosphorwolframsäure usw.) zu benutzen. Bei Anwendung dieses Verfahrens kann man auch den Arginingehalt der Extrakte wenigstens approximativ bestimmen, indem man das in oben beschriebener Weise erhaltene Argininnitrat wägt. Selbstverständlich sind aber die auf diesem Wege erhaltenen Zahlen etwas zu niedrig, da Substanzverluste nicht ganz zu vermeiden sind.

Zur Bestimmung der Ausbeute kann man statt des Argininnitrats auch das aus letzterem dargestellte Argininkupfernitrat wägen. Doch ist darauf aufmerksam zu machen, daß durch das Vorhandensein von Beimengungen in manchen Fällen dieses Produkt am vollständigen Auskristallisieren verhindert wird.

---

b) Isolierung von Cholin, Betain und Trigonellin aus Pflanzenextrakten.

Von **E. Schulze** und **E. Winterstein**, Zürich.

Die in den Pflanzenextrakten durch Phosphorwolframsäure hervorgebrachten Niederschläge enthalten in sehr vielen Fällen auch Cholin, $C^5H^{15}NO^2$; nicht selten wird dasselbe begleitet von Betain, $C^5H^{11}NO^2$, oder von Trigonellin, $C^7H^7NO^2$ (daß diese beiden Basen nebeneinander auftreten, ist bisher nicht beobachtet worden). Bei Verarbeitung jener Niederschläge nach dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Verfahren gehen die genannten drei Basen neben dem Lysin in das Filtrat vom Argininsilberniederschlage ein. Wie oben angegeben ist, führt man die in diesem Filtrat enthaltenen Basen, nachdem sie wieder durch Phosphorwolframsäure ausgefällt worden sind, in die salzsauren Salze über: die wässerige Lösung der letzteren wird eingedunstet, der Verdampfungsrückstand nach völligem Austrocknen mit kaltem absoluten Alkohol behandelt, wobei vorzugsweise Cholinchlorid in Lösung geht; auf Zusatz von alkoholischer Mercurichloridsolution scheidet sich das Cholin fast vollständig in Form des in Alkohol fast unlöslichen Cholinquecksilberchlorids aus. Dieses Doppelsalz wird unter Zusatz von etwas Mercurichlorid aus Wasser umkristallisiert, dann mittelst Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung wird eingedunstet, der Verdampfungsrückstand im Vakuumexsikkator vollständig ausgetrocknet, dann mit ganz wasserfreiem Alkohol in der Kälte behandelt. Die so erhaltene Lösung wird wieder eingedunstet, der Rückstand wieder in ganz wasserfreiem Alkohol aufgenommen. Dann führt man das Chlorid in das Chloroplatinat über, indem man seine alkoholische Lösung mit einer alkoholischen Platinchloridsolution versetzt. Der dabei erhaltene Niederschlag wird, nachdem er abfiltriert und mit Weingeist gewaschen worden ist, in Wasser gelöst, die Lösung zur Kristallisation gebracht. Falls es nötig erscheint, wird das Produkt noch einmal aus Wasser umkristallisiert. Bei der Zerlegung mittelst Schwefelwasserstoff liefert das Chlorplatinat reines, in zerfließlichen dünnen Prismen kristallisierendes Cholinchlorid. Zur Identifizierung des Cholins kann man den Platingehalt des Chloroplatinats oder den Goldgehalt des

aus dem Chlorid dargestellten Chloraurats bestimmen: auch können für diesen Zweck die Reaktionen des Chlorids zu Hilfe genommen werden.

Den in kaltem absoluten Alkohol unlöslichen Teil des Gemenges der Chloride behandelt man mit kochendem 95%igen Alkohol, um Betainchlorid und Trigonellinchlorid zu extrahieren. Die dabei erhaltenen Lösungen versetzt man mit einer alkoholischen Mercurichloridsolution. Betain und Trigonellin scheiden sich in Form von Quecksilberdoppelsalzen aus. Das Trigonellinquecksilberchlorid ist in Alkohol sehr wenig löslich, während das Betainquecksilberchlorid sich darin etwas mehr löst; es empfiehlt sich daher, die von letzterem abfiltrierte Lösung einzuengen, um das darin enthaltene Doppelsalz noch größtenteils zu gewinnen. Beide Doppelsalze werden unter Zusatz von etwas Mercurichlorid aus Wasser umkristallisiert, dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierten Lösungen werden zur Kristallisation gebracht, die Kristalle, falls dies nötig erscheint, noch einmal aus Wasser umkristallisiert.

Zur Identifizierung des Betains stellt man das in Blättchen und Nadeln kristallisierende Chloraurat dar und unterwirft dasselbe der Analyse. Selbstverständlich können behufs der Identifizierung auch die Reaktionen des Chlorids zu Hilfe genommen werden. Auch bei der Identifizierung des Trigonellins ist die Untersuchung der Golddoppelsalze von Wichtigkeit. Versetzt man eine konzentrierte wässerige Lösung von Trigonellinchlorid mit Goldchlorid, so scheidet sich ein neutrales Chloraurat aus, welches aus Wasser unter Zusatz von etwas Goldchlorid umkristallisiert werden kann, ohne eine Änderung in seiner Zusammensetzung zu erleiden; dieses Chloraurat schmilzt bei 196°. Wenn man dasselbe aus Wasser umkristallisiert, so verwandelt es sich in ein basisches Salz, $(C_7 H_7 NO_2)_4 (HCl\,Au\,Cl_3)_3$, welches konstant bei 185—186° schmilzt und 37·7% Gold enthält.

Wenn es sich darum handelt, aus einem Phosphorwolframsäureniederschlage Cholin, Betain und Trigonellin zu isolieren, so ist es nicht erforderlich, zunächst die Alloxurbasen, das Arginin und das Histidin zu entfernen und erst das Filtrat vom Argininsilberniederschlage auf die genannten drei Basen zu verarbeiten; man kann das folgende kürzere Verfahren anwenden: Der Niederschlag wird durch Verreiben mit Baryumhydroxyd und Wasser zerlegt, das Ammoniak in früher beschriebener Weise ausgetrieben; dann entfernt man das phosphorwolframsaure Baryum durch Filtration, befreit das Filtrat durch Einleiten von Kohlensäure vom Baryt und übersättigt es sodann mit Salzsäure. Die in dieser Weise erhaltene Lösung der Chloride wird eingedunstet, der Verdampfungsrückstand getrocknet. Man kann diesen Rückstand zunächst zur Lösung des Cholinchlorids mit kaltem absoluten Alkohol, dann zur Lösung von Betainchlorid und Trigonellinchlorid mit kochendem 95%igem Alkohol behandeln. Da aber in diesem Falle eine scharfe Trennung des Cholinchlorids von den anderen Chloriden nicht zu erzielen ist, so ist es ebenso bequem, jenen Rückstand direkt mit 95%igem Alkohol zu erhitzen und aus der

dabei erhaltenen Lösung Cholin, Betain und Trigonellin durch Zusatz von alkoholischer Mercurichloridsolution zusammen zu fällen. Die in dieser Weise erhaltenen Quecksilberdoppelsalze werden aus heißem Wasser umkristallisiert, wobei man durch fraktionierte Kristallisation eine partielle Trennung des schwerer löslichen Cholinquecksilberchlorids von den anderen Quecksilberdoppelsalzen erreichen kann; dann werden sie mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber abfiltrierten Lösungen eingedunstet, die dabei zurückbleibenden Chloride im Vakuumexsikkator getrocknet. Diese Chloride behandelt man sodann, um das Cholinchlorid in Lösung zu bringen, mit wasserfreiem Alkohol. Da das Betainchlorid und das Trigonellinchlorid darin zwar sehr schwer löslich, aber doch nicht ganz unlöslich sind [1]), so behandelt man die Cholinchloridlösung in der oben schon angegebenen Weise; man dunstet dieselbe ein, trocknet den Rückstand im Vakuumexsikkator und nimmt ihn sodann wieder in wasserfreiem Alkohol auf; diese Operation wird, falls es nötig erscheint, noch einmal wiederholt (selbstverständlich wendet man dabei nur soviel Alkohol an, als zur Lösung des Cholinchlorids eben erforderlich ist). Die bei der Behandlung mit Alkohol ungelöst gebliebenen Chloride des Betains und des Trigonellins werden aus Wasser umkristallisiert.

Die Schwerlöslichkeit der Quecksilberdoppelsalze des Cholins, Betains und Trigonellins macht es möglich, diese Basen auch ohne Anwendung von Phosphorwolframsäure aus den Extrakten zur Abscheidung zu bringen. Wenn man einen wässerigen, von den durch Bleiessig fällbaren Substanzen befreiten Extrakt eindunstet, den Verdampfungsrückstand mit kochendem 95%igen Alkohol behandelt und der in dieser Weise erhaltenen Lösung eine alkoholische Mercurichloridsolution zufügt, so werden, falls Cholin, Betain und Trigonellin vorhanden sind, diese Basen als Quecksilberdoppelsalze gefällt; diese Doppelsalze können durch Umkristallisieren aus Wasser gereinigt werden. Doch ist dieses Verfahren zur Darstellung der genannten Basen weniger empfehlenswert als das vorher beschriebene (Fällung mit Phosphorwolframsäure usw.).

Man kann zur Darstellung der drei Basen auch alkoholische Extrakte aus Pflanzen oder Pflanzenteilen verwenden. Diese Extrakte werden eingedunstet, die Verdampfungsrückstände mit Wasser behandelt, die dabei erhaltenen trüben Flüssigkeiten mit Bleiessig versetzt, nach dem Abfiltrieren der Bleiniederschläge durch Schwefelwasserstoff von Blei befreit und schließlich eingedunstet. Die Verdampfungsrückstände behandelt man mit heißem Alkohol und versetzt die dabei erhaltenen Lösungen zur Fällung der genannten Basen mit einer alkoholischen Mercurichloridsolution. Doch ist es keineswegs sicher, daß bei Behandlung getrockneter Pflanzen oder Pflanzenteile mit kochendem Alkohol die genannten Basen vollständig in Lösung gehen; für das Cholin wenigstens ist bestimmt nachgewiesen worden, daß dies nicht immer der Fall ist.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 60. S. 168 ff. (1909).

Zur Bestimmung der aus einem Untersuchungsobjekte erhaltenen Ausbeute an Cholin wägt man das in oben beschriebener Weise erhaltene Cholinchlorid unter den erforderlichen Vorsichtsmaßregeln (bekanntlich ist dieses Salz sehr hygroskopisch). Gesetzt aber auch, daß man zur Gewinnung des Cholins das beste Verfahren (Fällung mit Phosphorwolframsäure usw.) verwendet und sorgfältig arbeitet, so sind doch kleine Substanzverluste nicht zu vermeiden. Wenn auch aus einer reinen, mit Schwefelsäure genügend stark angesäuerten Cholinchloridlösung das Cholin durch Phosphorwolframsäure bis auf einen sehr geringen Rest gefällt wird[1]), so muß man doch annehmen, daß die Fällung der Base aus Pflanzenextrakten infolge des Vorhandenseins anderer Extraktbestandteile eine weniger vollständige ist; auch durch Mercurichlorid wird die genannte Base aus alkoholischer Lösung nicht ganz vollständig gefällt. Man hat daher anzunehmen, daß die Ausbeute an Cholin hinter der im Untersuchungsobjekt vorhandenen Cholinmenge stets etwas zurückbleibt. Das gleiche gilt für die Zahlen, die man bei Bestimmung der Ausbeute an Betain und Trigonellin erhält. Auch diese Bestimmung wird am besten in der Weise ausgeführt, daß man die zur Ausscheidung gebrachte Quantität von Betainchlorid und Trigonellinchlorid wägt.

Nach *Stanek*[2]) kann man aus den Pflanzenextrakten Cholin und Betain auch durch Kaliumperjodid fällen. Nach der von *A. Kiesel*[3]) ausgeführten Prüfung steht dieses Verfahren aber hinter dem gewöhnlich angewendeten an Brauchbarkeit zurück. Denn die durch das Kaliumtrijodid in den Extrakten hervorgebrachten Niederschläge besitzen häufig eine ölige, ihre Verarbeitung erschwerende Beschaffenheit und schließen ferner neben Cholin und Betain in vielen Fällen noch andere Stickstoffverbindungen ein, deren Trennung von den genannten Basen beträchtliche Mühe verursacht. Nach *Staneks* Angaben kann sein Verfahren aber auch zur Trennung von Cholin und Betain benutzt werden, da die zuletzt genannte Base nur in saurer, das Cholin dagegen auch in alkalischer Lösung durch das oben genannte Reagenz gefällt wird.

Darstellung aus den Bockshornsamen[4]) (Trigonella foenum graecum). Die gepulverten Samen werden mit 70%igem Weingeist ausgezogen, der vom Alkohol durch Destillation befreite Extrakt wird mit Bleiessig unter Zusatz von Soda gereinigt. Das vom Blei befreite Filtrat wird

---

[1]) In Versuchen, die von *E. Schulze* und *G. Trier* ausgeführt wurden, gingen unter den oben angegebenen Bedingungen zirka 97% des Cholins in den Phosphorwolframsäureniederschlag ein. Fast die gleiche Zahl ergab sich für Betain und Trigonellin in Versuchen, in denen die Fällbarkeit dieser Basen durch Phosphorwolframsäure geprüft wurde.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 280; Bd. **47**. S. 83 und Bd. **48**. S. 334.

[3]) Ebenda. Bd. **53**. S. 215.

[4]) *E. Jahns*, Über die Alkaloide des Bockshornsamens. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 2518 (1885).

zum dünnen Sirup eingedunstet und die Basen durch Jodkalium-Wismuthjodid unter Zusatz von Schwefelsäure gefällt. Dieser Niederschlag enthält neben den Basen auch Eiweißstoffe, es ist daher wohl angezeigt, die Extraktion der Samen mit 95%igem Alkohol in der Wärme vorzunehmen. Die mit Jodkalium-Wismuthjodid auftretende Fällung erfolgt nicht vollständig, erst nach längerem Stehen. Der entstandene Niederschlag wird mit Soda zersetzt, das vom Wismuthniederschlag getrennte Filtrat wird mit Schwefelsäure genau neutralisiert und dann mit soviel Quecksilberchloridlösung gefällt, bis kein überschüssiges Jodnatrium mehr vorhanden ist und der entstehende hellgelbe Niederschlag einen rötlichen Ton annimmt. Die dabei auftretende Fällung schließt das Cholin ein, man filtriert ab, säuert mit Schwefelsäure an, wobei sich das Trigonellin-Quecksilberjodid in öligen, bald kristallinisch erstarrenden Tropfen ausscheidet. Aus der Mutterlauge können durch weiteres Konzentrieren und Zusatz von Quecksilberchlorid eventuell noch weitere Mengen davon erhalten werden. Aus dem Quecksilberdoppelsalz wird die Base in bekannter Weise erhalten.

Stachydrin.

Das Stachydrin, $C_7H_{13}NO_2$, welches bis jetzt nur in zwei Pflanzenarten[1]) gefunden wurde, ist in seinem Verhalten dem Betain sehr ähnlich; es wird durch Phosphorwolframsäure gefällt und gibt mit Merkurichlorid ein schwer lösliches Doppelsalz. Zu seiner Darstellung aus Pflanzenextrakten kann man ebenso verfahren, wie es oben für das Betain angegeben worden ist. Da aber das salzsaure Stachydrin in kaltem absolutem Alkohol ziemlich löslich ist, so kann man es nicht scharf mit Hilfe dieses Lösungsmittels vom Cholin trennen; das genannte Salz läßt sich jedoch von dem in Wasser sehr leicht löslichen Cholinchlorid befreien, indem man es aus Wasser umkristallisiert und die dabei erhaltenen großen luftbeständigen Prismen durch Abpressen zwischen Fließpapier oder durch Aufbringen auf eine Tonplatte von der Mutterlauge trennt. Auch kann man das Cholin aus einer alkalisch gemachten Lösung durch Kaliumtrijodid fällen, wobei das Stachydrin in Lösung bleibt. Zur Identifizierung des Stachydrins ist die Untersuchung seines Chlorplatinats zu empfehlen. Letzteres scheidet sich aus, wenn man die alkoholische Lösung des Stachydrinchlorids mit Platinchlorid versetzt. Aus Wasser kristallisiert das Chloroplatinat bei langsamem Verdunsten der Lösung in großen rhombischen Kristallen, die von *K. v. Haushofer*[2]) gemessen worden sind; es enthält 27·94% Platin.

Guanidin.

Die in den Pflanzenextrakten durch Phosphorwolframsäure hervorgebrachten Niederschläge können Guanidin, CH_5N_3, enthalten. Verarbeitet

[1]) Es ist in den Wurzelknollen von Stachys tuberifera und in den Blättern der Orange gefunden worden.

[2]) Archiv der Pharmazie, Bd. 231, Heft 4, S. 310.

man solche Niederschläge in der oben beschriebenen Weise, so kann das Guanidin partiell in den durch Silbernitrat und Barytwasser erzeugten Argininsilberniederschlag eingehen. Führt man das Arginin in die schwer lösliche Verbindung mit Kupfernitrat über, so bleibt das Guanidin in der Mutterlauge; wenn man diese Mutterlauge mittelst Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit und sodann mit Natriumpikrat versetzt, so scheidet sich Guanidinpikrat aus.

Was den im Filtrat vom Argininsilberniederschlag noch enthaltenen Teil des Guanidins betrifft, so kann man für seine Trennung vom Cholin, Betain und Trigonellin den Umstand benutzen, daß das Guanidin in alko-

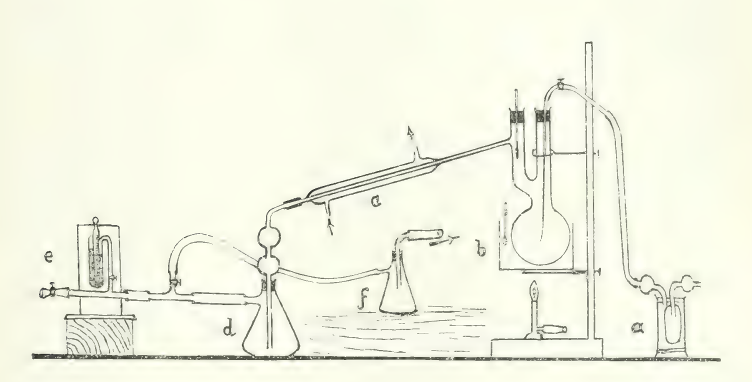


Fig. 43.

a Waschflasche mit verd. Schwefelsäure. *b* Wasserbad mit Destillationskolben, in welchen das gepulverte Material mit Hilfe eines auf den Boden des Kolbens reichenden Trichters eingefüllt wird. *c* Kühler mit dem Absorptionsgefäß direkt verbunden. *d* Absorptionsgefäß mit $^1/_{10}$ N.-Schwefelsäure. *e* Vakuummeter. *f* Sicherheitsflasche mit der Wasserstrahlpumpe verbunden.

holischer Lösung durch Merkurichlorid nicht gefällt wird. Vom Lysinchlorid läßt sich das in Alkohol leicht lösliche Guanidinchlorid mit Hilfe dieses Lösungsmittels trennen. Bei der Identifizierung des Guanidins kann die Darstellung und Untersuchung seines Chloraurats gute Dienste leisten.

Aus etiolierten Keimpflanzen von Vicia sativa konnte Guanidin isoliert werden, indem man einen weingeistigen Extrakt aus den getrockneten Pflänzchen eindunstete, den Verdampfungsrückstand mit Wasser behandelte, die mittelst Bleiessig gereinigte Lösung mit Phosphorwolframsäure versetzte, den dabei erhaltenen Niederschlag mit Baryumhydroxyd zerlegte und die dabei gewonnene Basenlösung mit Salpetersäure neutralisierte; diese

Lösung lieferte beim Eindunsten Kristalle von Guanidinnitrat. Ohne Zweifel wird dieses Verfahren zur Isolierung des Guanidins nicht brauchbar sein, falls die genannte Base nur in sehr kleiner Menge sich vorfindet.

Quantitative Bestimmung des Ammoniaks in pflanzlichen Organen.

2—3 *g* Substanz übergießt man mit ca. 100 cm^3 Wasser in einem Fraktionierkolben, füllt mit Hilfe eines breiten bis auf den Boden des Kolbens reichenden Trichters gut gewaschene Magnesia und destilliert im Vakuum etwa 80 cm^3 Flüssigkeit ab. Um das Aufschäumen zu verhindern, fügt man 1—2 Tropfen filtriertes Butterfett hinzu. Die übergehende Flüssigkeit wird in einer mit 10 cm^3 $^1/_2$n-Schwefelsäure versehenen Vorlage aufgesammelt. Sind die Extrakte bzw. ist das Gemisch mit Wasser stark sauer, so neutralisiert man zuvor mit Soda. Die Einrichtung, wie sie Fig. 43 zeigt, hat sich bei uns sehr gut bewährt.

Partielle Hydrolyse von Proteinen.

Von **Emil Abderhalden**, Berlin.

a) Isolierung von Polypeptiden unter den Abbauprodukten der Proteine.

Die zur Isolierung von Polypeptiden unter den Abbauprodukten der Proteine[1]) bisher angewandten Methoden sind dreierlei Art. Die eine stützt sich auf die Eigenschaft der Ester der Dipeptide, namentlich der aus den einfachen Aminosäuren aufgebauten, leicht in das 2·5-Diketopiperazin überzugehen. Eine zweite Methode beruht auf der Darstellung schwer löslicher Derivate von Polypeptiden, wie z. B. der β-Naphtalinsulfoverbindung, und ein dritter Weg ist die direkte Isolierung der Polypeptide selbst.

Die Isolierung von Dipeptiden mit Hilfe von deren Ester und den daraus darstellbaren Anhydriden war bis jetzt am erfolgreichsten. Der Gang einer derartigen Untersuchung ist folgender. Der zu untersuchende Eiweißkörper wird nicht mit Säuren gekocht, sondern mit diesen bei Zimmertemperatur oder höchstens bei 37° aufbewahrt. Zur Hydrolyse werden rauchende Salzsäure vom spez. Gew. 1·19 und 70%ige Schwefelsäure benutzt. Die Dauer der Einwirkung dieser Säuren ist je nach dem gewählten Protein eine ganz verschiedene. Es muß in jedem Einzelfalle durch einen direkten Versuch ausprobiert werden, welches die besten Versuchsbedingungen sind, da auf diesem Gebiete jede Erfahrung fehlt. Nach den gemachten Beobachtungen wird man dann die Dauer der Einwirkung der gewählten Säure, deren Konzentration und die Temperatur, bei der die Hydrolyse vor sich gehen soll, bestimmen. So wurde z. B. gefunden, daß beim Seidenfibroïn fünftägiges Stehen mit der sechsfachen Menge 70%iger Schwefelsäure bei 18° eine gute Ausbeute an Dipeptiden liefert. Wählt man andere Versuchsbedingungen, dann erhält man entweder wenig Dipeptide

[1]) *Emil Fischer* und *Emil Abderhalden*, Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroins. Berichte d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. **39**. S. 752. 1906. — Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Ebenda. Jg. **39**. S. 2315. 1906. — Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Ebenda. Jg. **40**. S. 3544. 1907.

und größere Mengen komplizierter gebaute Produkte oder umgekehrt viele Aminosäuren, wenn die Hydrolyse eine vollständigere ist. Hat man zur Hydrolyse Schwefelsäure gewählt, so wird diese quantitativ mit Baryt entfernt. Ist die Hydrolyse durch Salzsäure herbeigeführt worden, so wird deren Hauptmenge mit Kupferoxydul gebunden. Es lohnt sich in beiden Fällen, das ganze Gemisch von Spaltungsprodukten mit Phosphorwolframsäure zu fällen und das Filtrat des Niederschlages für sich zu untersuchen. Es gelingt so bis zu einem gewissen Grade, die komplizierteren Produkte von den einfacheren zu trennen. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird mit Baryt zerlegt und aus dem Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wird der Überschuß des Fällungsmittels mit Baryt, und dessen Überschuß mit Schwefelsäure genau entfernt. Zur weiteren Trennung der Abbauprodukte wird die Estermethode angewandt, und zwar wird die Veresterung in genau derselben Weise durchgeführt, wie es bei der Isolierung der Aminosäuren geschildert worden ist, mit der Ausnahme, daß hier die gasförmige, trockene Salzsäure unter Kühlung eingeleitet wird. Mit ganz besonders großer Sorgfalt wird jede höhere Temperatur auch beim Eindampfen der alkoholischen, die Esterchlorhydrate der Abbauprodukte enthaltenden Lösung ausgeschlossen. Das Verdampfen erfolgt bei 10—15 *mm* Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades, aus dem destilliert wird. Die Veresterung wird wiederholt, und schließlich werden die Ester mit der auf den Chlorgehalt berechneten Menge Natrium, gelöst in Alkohol, in Freiheit gesetzt, und die Ester destilliert, und zwar bis 100° des Wasserbades. Es gehen hierbei die Ester der Monoaminosäuren über, während die Ester der komplizierteren Spaltprodukte und vor allem auch die Dipeptidester nicht destillieren. Um noch die erst bei höherer Temperatur siedenden Aminosäureester zu entfernen, wird der Destillationsrückstand mit trockenem Äther ausgeschüttelt, und dann der ungelöste Rückstand in Alkohol gelöst. Beim Stehen scheiden sich bald aus dem Alkohol Substanzen ab, zum Teil in kristallisiertem, zum Teil in amorphem Zustand. Es sind dies die Anhydride, die sich aus den Dipeptidestern bilden. Ihre Entstehung kann durch Erwärmen der Lösung und vor allem durch Einleiten von Ammoniak beschleunigt werden. Im allgemeinen empfiehlt es sich, die Anhydride durch einfaches Stehenlassen zur Abscheidung zu bringen.

Auf diesem Wege gelingt es, die einfachen Aminosäuren, die Dipeptide und die komplizierter gebauten Produkte zu trennen. Durch eingehende Kontrollversuche wurde die Bildung der beobachteten Anhydride aus den Aminosäureestern ausgeschlossen. Sie stammen unzweifelhaft von im Hydrolysat vorhandenen Dipeptiden.

Die eben geschilderte Methode zum Nachweis von Polypeptiden hat zwei Nachteile. Einmal ist sie nur auf Dipeptide anwendbar und dann ergibt sie nicht, welches Dipeptid in Wirklichkeit bei der Hydrolyse entstanden ist. Wird z. B. Glycyl-d-alaninanhydrid isoliert, so bleibt die Frage offen, ob dieses aus Glycyl-d-alanin oder aus d-Alanyl-glycin entstanden ist.

Es läßt sich in diesem Falle nur aussagen, daß ein aus Glykokoll und d-Alanin bestehendes Dipeptid aufgefunden worden ist.

Wird zur Isolierung von Polypeptiden β-Naphtalinsulfochlorid angewendet, so wird in genau der gleichen Weise vorgegangen, wie bei der Darstellung von β-Naphtalinsulfoderivaten der Aminosäuren (vgl. S. 495). Die β-Naphtalinsulfoverbindungen der Polypeptide haben noch eine ganz besondere Bedeutung durch die Beobachung erlangt, daß es gelingt, bei der totalen Hydrolyse unter bestimmten Bedingungen die Polypeptidkette so zu sprengen, daß die Bindung der β-Naphtalinsulfogruppe mit der Aminosäure erhalten bleibt. Wird z. B. β-Naphtalinsulfo-glycyl-d-alanin mit 10%iger Salzsäure gekocht, so entsteht neben d-Alanin β-Naphtalinsulfo-glycin. Bei Dipeptiden läßt sich auf diese Weise die Struktur feststellen, und bei höheren Polypeptiden kann man wenigstens die Stellung der mit dem β-Naphtalinsulfochlorid reagierenden Aminosäure genau bestimmen. Kompliziertere Verhältnisse treten dann ein, wenn Tyrosin am Aufbau eines Polypeptids beteiligt ist. Es kann je nach seiner Stellung im Polypeptid eine oder zwei β-Naphtalinsulfogruppen aufnehmen.

Sehr schwierig gestaltet sich die direkte Isolierung von Polypeptiden aus den Abbauprodukten einer partiellen Hydrolyse. Wir sind einstweilen auf tastende Versuche angewiesen. Bestimmte Regeln lassen sich nicht angeben.[1]) In erster Linie wird man nach typischen Fällungsreaktionen suchen. Sehr zweckmäßig wird zunächst eine Trennung der verschiedenartigen Abbauprodukte durch Phosphorwolframsäure herbeigeführt und dann mit Quecksilbersulfat (vgl. Tryptophan S. 487) auf tryptophanhaltige Produkte und mit Silbernitrat nach vorheriger Neutralisation mit Ammoniak auf Abbauprodukte, an deren Aufbau Glutaminsäure beteiligt ist, gefahndet, ferner wird man Sublimat zum Nachweis histidinhaltiger Körper verwenden usw. Eine systematische Anwendung aller bekannten Fällungsreaktionen gestattet wenigstens, das große Gemenge von Spaltprodukten in mehr einheitliche Gruppen zu trennen. Es wird wohl selten gelingen, ein komplizierteres Spaltprodukt direkt nach seinem Aufbau aufzuklären. In allen Fällen wird man ein isoliertes Produkt so lange reinigen und von Beimengungen trennen, bis es auf eine bestimmte Kombination von Aminosäuren passende Analysenzahlen gibt und auch das Molekulargewicht und das Resultat der totalen Hydrolyse in Einklang mit der angenommenen Verbindung steht. Man wird dann versuchen, durch partielle Hydrolyse zu einfacheren Produkten zu gelangen und ferner vor allem auch den Verlauf des fermentativen Abbaus verfolgen. In letzter Linie sind wir auf die synthetisch dargestellten Polypeptide angewiesen und erst, wenn ein erhaltenes Produkt mit einem solchen in jeder Beziehung übereinstimmt, wird man von einem Abbauprodukt bekannter Art sprechen dürfen. Hervorgehoben sei noch, daß in manchen Fällen die Einführung

---

[1]) Vgl. hierzu *Emil Abderhalden*, Partielle Hydrolyse einiger Proteine. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 58. S. 386 (1909).

von Halogen, speziell von Jod oder Brom von großem Werte sein kann. So sind z. B. die jodierten tyrosinhaltigen Polypeptide in Wasser sehr schwer löslich, ferner kann der Halogengehalt von Abbauprodukten einen weiteren Anhaltspunkt für die Molekulargewichtsbestimmung geben.

In manchen Fällen wird man zur partiellen Hydrolyse mit Vorteil Natron- resp. Kalilauge und noch besser gesättigte Barytlösung anwenden. Im letzteren Falle läßt sich der Baryt leicht quantitativ mit Schwefelsäure entfernen, und man kann dann versuchen, durch Kristallisation oder durch Fällungsmittel zu geeigneten Produkten zu gelangen. Die Identifizierung der erhaltenen Verbindungen mit synthetisch dargestellten Polypeptiden stößt nur insofern auf Schwierigkeiten, als die durch Abbau mit Baryt erhaltenen Produkte entweder vollständig oder doch zum größten Teil razemisiert sind und gerade dem Drehungsvermögen eine sehr große Bedeutung bei der Feststellung der Art eines isolierten Körpers zukommt. In einem solchen Falle dürfte der Abbau durch Fermente eine Entscheidung bringen. So würde z. B. bei der Auffindung eines aus Glykokoll und dl-Alanin bestehenden Dipeptids die Frage, ob Glycyl-alanin oder Alanyl-glycin vorliegt, dadurch zu beantworten sein, daß man eine Lösung des optisch inaktiven Dipeptids mit Erepsin spaltet. Es wird nur diejenige Kombination von Aminosäuren gespalten, die den in der Natur vorkommenden Komponenten entspricht, d. h. die Spaltung erfolgt asymmetrisch. Wir würden also entweder Glycyl-l-alanin resp. l-Alanyl-glycin übrig behalten. Das Vorhandensein der einen oder anderen Verbindung müßte sich an der Art und dem Grade des Drehungsvermögens der Lösung des Dipeptids nach erfolgter asymmetrischen Spaltung kundgeben.[1])

[1]) Vgl. hierzu: Emil Abderhalden: Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Spaltprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 61 (1909).

b) Isolierung von Peptonen.

Von **M. Siegfried,** Leipzig.

1. Definition der Peptone.

Peptone sind Säuren, welche bei der Einwirkung von proteolytischen Fermenten auf Proteinkörper entstehen, durch Ammoniumsulfat unter keinen Bedingungen aussalzbar sind und durch siedende Mineralsäuren unter Bildung von Aminosäuren gespalten werden.

2. Darstellung von Peptonen.

Es kommen hier nur Methoden in Betracht, welche Peptone als solche darstellen lassen. Da die älteren Verfahren der Fällung durch Alkohol nach Entfernung der durch Ammonsulfat fällbaren Substanzen unzulänglich sind, ist nur die „Eisenmethode"[1]) zu besprechen.

Beispiel I. Darstellung von Pepsinglutinpepton.[2])

A. Herstellung der Verdauungslösung.

Als Ausgangsmaterial ist die reinste Gelatine des Handels, d. i. die aus Häuten hergestellte, sogenannte Ledergelatine, der ersten Abkochungen zu verwenden. Diese Sorten besitzen das größte Gelatinierungsvermögen und geben fast klare, wässerige Lösungen von selbst 20% Gelatine. (Eine solche Gelatine ist die von der Firma Theuerkauf und Scheibner, Leipzig, käufliche Marke: Gelatina alba 00.)

1 *kg* Gelatine wird in ca. 8 *l* kaltem Wasser über Nacht quellen gelassen, das Wasser wird abgegossen und noch 2mal erneuert. Nach Abgießen des letzten Waschwassers wird die gequollene Gelatine auf dem Wasserbade erwärmt, wodurch eine Lösung entsteht, die zu einem Volum von ca. 15 *l* mit Wasser verdünnt wird. Der Lösung wird soviel (245 cm^3) 25%iger Salzsäure zugefügt, daß die Konzentration an HCl $0 \cdot 4\%$ beträgt. Die Lösung wird auf Körpertemperatur gebracht und mit 5 *g* „Pepsinum purissimum" (Dr. *G. Grübler*) und 10—15 cm^3 Toluol vermischt. Die Verdauung geschieht

---

[1]) *M. Siegfried,* Über Antipepton. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **35**. S. 164 (1902).

[2]) *W. Scheermesser,* Über Pepsinglutinpepton. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **41**. S. 68 (1904) und *M. Siegfried* und *H. Schmitz,* noch nicht veröffentlicht.

am besten in einem Verdauungsapparate, der mit einem durch einen Elektromotor getriebenen Rührwerk versehen ist: in Ermanglung eines solchen in einem Glaskolben, der sich in einem Wasserbade von 40° oder in einem Verdauungsschrank befindet und täglich mehrere Male umgeschüttelt wird. Ist das Gefäß nicht vollständig verschlossen, so werden täglich von neuem 10—15 *cm*³ Toluol zugegeben. Nach je 5 Tagen werden wieder 5 *g* Pepsin zugefügt.

Sobald das Verdauungsgemisch Kongopapier nicht mehr deutlich bläut (in der Regel nach 3 Tagen), wird soviel 2%ige Salzsäure zugesetzt, daß die ganze Flüssigkeit 0·3% HCl enthält. Ist die Reaktion auf Kongopapier wieder sehr schwach geworden (in der Regel nach 8 weiteren Tagen), so wird soviel 2%ige Salzsäure zugefügt, daß die Konzentration der ganzen Flüssigkeit an HCl 0·2% beträgt. Nach abermaligem Verschwinden der Kongoreaktion (in der Regel nach weiteren 12 Tagen) wird die Flüssigkeit durch Zusatz 2%iger Salzsäure 0·1% HCl-haltig gemacht.

Die Maximalausbeute an Pepton wird gewöhnlich nach 30tägiger Verdauung erhalten. Da sie aber von der Qualität des Pepsins abhängig ist, wird die Bildung des Peptons in folgender Weise kontrolliert:

B. Kontrolle der Verdauung.

Von Zeit zu Zeit, nach 8tägiger Verdauung beginnend, werden der Verdauungsflüssigkeit 30 *cm*³ entnommen, mit kristallisiertem Ammonsulfat gesättigt, mit wässeriger Ammoniaklösung, die mit Ammonsulfat gesättigt ist, neutralisiert und filtriert. Vom Filtrate werden je 10 *cm*³ mit einer Lösung von folgender Zusammensetzung titriert:

10 *g* Ferriammoniumsulfat,
200 *g* Ammoniumsulfat,
250 *g* Wasser.

Diese Lösung wird aus der Bürette zugesetzt, bis keine Fällung mehr entsteht und die Tüpfelprobe mit Rhodankalium gerade das Vorhandensein von Ferriionen erkennen läßt. Die Menge der verbrauchten Titerlösung ist proportional der Menge des vorhandenen Peptons.

C. Isolierung des Peptons.

Nimmt die Menge des gebildeten Peptons bei weiterer Verdauung nicht mehr zu, so wird die Verdauungsflüssigkeit bei 40° mit kristallisiertem, asche- und Cl-freiem Ammonsulfat gesättigt. Es werden ca. 13 *kg* dieses Salzes gebraucht. Nach dem Erkalten wird filtriert, das Filtrat geprüft, ob es auf Zusatz von ammonsulfatgesättigtem, wässerigem Ammoniak eine Ausscheidung gibt. Ist dies der Fall, so wird die ganze Lösung mit ammonsulfatgesättigtem Ammoniak versetzt, bis keine Trübung mehr entsteht. Ferner wird geprüft, ob ammonsulfatgesättigte, verdünnte Schwefelsäure eine Fällung gibt. Ist dies der Fall, so wird so lange mit ammonsulfatgesättigter Schwefelsäure versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht.

Ist in keiner Weise mehr eine Albumoseausscheidung zu erreichen, so wird das ganz klare Filtrat mit ammonsulfatgesättigtem Ammoniak neutralisiert und in dasselbe so lange unter ständigem Rühren feingepulvertes Ferriammonsulfat eingetragen, bis eine filtrierte Probe mit ammonsulfatgesättigter, wässeriger Ferriammonsulfatlösung keine Fällung, sondern mit Rhodankaliumlösung eine schwache Rotbraunfärbung gibt. Es werden ca. 100 *g* Eisenammoniakalaun gebraucht. Der Niederschlag wird auf der Nutsche zunächst ohne Ansaugen filtriert, dann abgesaugt und mit gesättigter Ammonsulfatlösung chlorfrei gewaschen.

Zur Entfernung der letzten Albumosereste wird der Niederschlag folgendermaßen umgefällt:

Der Niederschlag wird mit 2 *l* Wasser gut verrieben, wobei er sich fast vollständig löst. Hierauf wird erst wenig wässeriges Ammoniak zugegeben, wodurch eine klare Lösung eintritt, und hierauf ca. 50 cm^3 konzentrierten (20%), wässerigen Ammoniaks. Hat sich das gebildete Eisenoxydhydrat abgesetzt, wird filtriert und der Niederschlag mit Wasser ausgewaschen. Das mit den Waschwässern vereinigte Filtrat wird mit Schwefelsäure neutralisiert und bei 40° mit Ammonsulfat gesättigt.

Das Filtrat der erkalteten Lösung wird so lange mit ammonsulfatgesättigter, verdünnter Schwefelsäure vermischt, bis keine Trübung mehr entsteht. Nach Absetzen der ausgeschiedenen Albumosen wird filtriert und das Filtrat geprüft, ob es mit ammonsulfatgesättigtem Ammoniak eine Fällung gibt.

Ist dies der Fall, so wird das Filtrat solange mit ammonsulfatgesättigtem Ammoniak vermischt, bis keine Trübung mehr entsteht, und wieder filtriert.

Wenn sich nur geringe Mengen Albumosen ausscheiden, was namentlich oft bei der durch Schwefelsäure bewirkten Ausfällung der Fall ist, so lassen sich diese schwer filtrieren, da sie die Filter verstopfen. Man hilft sich durch folgenden Kunstgriff: Schnitzel von Filtrierpapier werden in gesättigter Ammonsulfatlösung ausgekocht und in der durch ausgeschiedene Albumosen trüben Flüssigkeit anhaltend verrührt. Die Albumosen haften dann an den Schnitzeln an, die Flüssigkeit wird klar und läßt sich leicht filtrieren.

In die jetzt albumosefreie, ammonsulfatgesättigte Lösung, die durch ammonsulfatgesättigtes Ammoniak bzw. ammonsulfatgesättigte Schwefelsäure neutralisiert ist, wird wieder feingepulvertes Ferriammonsulfat eingetragen, bis eine filtrierte Probe mit ammonsulfatgesättigter Lösung von Ferriammonsulfat keine Fällung, mit Rhodankalium eine schwache Ferrireaktion gibt. Der entstandene Niederschlag wird abgenutscht, mit gesättigter Ammonsulfatlösung sorgfältig gewaschen und mit ca. 2 *l* Wasser und etwas Ammoniak bei 40° verrieben, wobei sich der Niederschlag zunächst löst. Hierauf wird unter stetem kräftigem Rühren fein gepulvertes Barythydrat (aschefrei! Das gewöhnliche sogenannte reine Barythydrat ist nicht aschefrei) solange eingetragen, bis eine filtrierte Probe noch geringe Sulfatreaktion gibt. Ein Überschuß von Barythydrat ist zu vermeiden. Hierauf

saugt man ab, wäscht den Niederschlag gut mit Wasser aus und gibt zu dem mit den Waschwässern vereinigten Filtrate kalt gesättigtes Barytwasser im geringen Überschusse. Hierauf wird filtriert und das Filtrat durch etwas Ammoniumkarbonat vom Baryum befreit. Das Filtrat vom Baryumkarbonat wird im luftverdünnten Raume eingedampft, wobei die Temperatur der Flüssigkeit 40° nicht überschreiten soll. Das Niveau des Wassers, durch das der Siedekolben erwärmt wird, muß stets niedriger als das Niveau der Flüssigkeit im Kolben sein.

Der erhaltene Sirup wird in ca. 40 *cm*³ Wasser gelöst. Zu der gemessenen Lösung wird solange absoluter Alkohol gegeben, bis die zunächst entstehende Trübung beim Umschwenken eben wieder gelöst wird. Diese Lösung wird tropfenweise in absoluten (99°/₀) Alkohol, der beständig gerührt wird, eingetragen. Dabei wird für je 15 *cm*³ der wässerigen Peptonlösung (also auf das Volum vor dem Alkoholzusatz berechnet) 1 *l* Alkohol genommen. Das ausgefällte Pepton wird abgesaugt, mit 99°/₀igem Alkohol und dann wasserfreiem Äther gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Hierauf wird es umgefällt, indem auf 10 *g* Pepton 20 *cm*³ Wasser und 1 *cm*³ 25°/₀iger Essigsäure zur Lösung genommen werden und diese mit 15 *cm*³ 99°/₀igen Alkohols vermischte Lösung in 2 *l* 99°/₀igen Alkohols verrührt werden.

Es kommt häufig vor, daß das in Alkohol gefällte Pepton sich nicht völlig auch bei wochenlangem Stehen absetzt. Bisweilen wird dann das Absetzen durch Zusatz einiger Tropfen Essigsäure erreicht oder durch Sieden im Vakuum. Am zweckmäßigsten verfährt man jedoch in einem solchen Falle so, daß man die trübe Lösung abgießt, zunächst den Niederschlag auf die Nutsche bringt und über diesem die trübe Lösung absaugt. Auf diese Weise läßt sich das Pepton, wenn auch langsam, vollständig absaugen.

Ausbeute an umgefälltem Pepton: ca. 40 *g*.

Beispiel II. Darstellung von Trypsinfibrinpepton *x*.[1])

A. Herstellung der Verdauungslösung.[2])

8·7 *kg* in fließendem Wasser ausgewaschenes und abgepreßtes Blutfibrin (aus Rinderblut) = ca. 1·7 *kg* trockenes Fibrin werden in 13 *l* Wasser, in dem 20 *g* wasserfreies Natriumkarbonat aufgelöst sind, verknetet und verrührt; dazu werden 15 *cm*³ Toluol und 10 *cm*³ Chloroform gegeben und verrührt. Die Mischung wird nach Zusatz von 5 *g* hochwirksamen Trypsins der chemischen Fabrik Rhenania, Filiale Hamburg, 20 Stunden im Verdauungsbade gelassen.

Nach dieser Zeit ist das Fibrin fast völlig gelöst. Steht ein Verdauungsapparat mit Rührwerk zur Verfügung, so wird die Verdauung unter ständigem Rühren fortgesetzt, andernfalls wird täglich mehrere Male um-

¹) *M. Siegfried,* Über Antipepton. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35. S. 164 (1902).

²) *Fritz Müller,* Beiträge zur Kenntnis des Antipeptons. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38. S. 265 (1903).

gerührt bzw. umgeschüttelt. Täglich werden 10—15 *cm*³ Toluol und 5 bis 10 *cm*³ Chloroform zugegeben. Nach 6tägiger Verdauung werden noch 3 *g* Trypsin zugegeben. Im ganzen wird etwa 9 Tage verdaut.

B. Isolierung des Peptons.

In die Verdauungslösung werden 15 *kg* Ammonsulfat eingerührt; es wird ca. 15 Stunden bei Körpertemperatur bis zur Auflösung des Ammonsulfates und zum Zusammenballen der Albumosen weiter gerührt. Nach Erkalten wird von ausgeschiedenen Albumosen abgeseiht, der Albumosenniederschlag abgepreßt. Das durch Filtrieren durch Papier klar erhaltene Filtrat wird nach Beispiel I von Albumosen befreit und weiter verarbeitet. Aus dem nach Beispiel I umgefällten Eisenniederschlage I erhält man das Trypsinfibrinpepton β. Zur Ausfällung des Eisenniederschlages I sind 200 *g* Ferriammonsulfat verbraucht worden.

Die Zwischenfällung.

Um die letzten Reste des Trypsinfibrinpeptons β zu entfernen, wird das Filtrat vom Eisenniederschlage I mit ammonsulfatgesättigtem Ammoniak neutralisiert und in dasselbe 20 *g* Ferriammonsulfat eingerührt. Hierauf wird mit ammonsulfatgesättigtem Ammoniak neutralisiert und von dem Eisenniederschlage, der verworfen wird, filtriert.

Der Eisenniederschlag II.

In das Filtrat der Zwischenfällung wird solange abwechselnd feingepulvertes Ferriammonsulfat verrührt und ammonsulfatgesättigtes Ammoniak zugefügt, bis eine Probe des Filtrates nur noch eine schwache Biuretreaktion gibt. Es werden ca. 1100 *g* Ferriammonsulfat gebraucht. Der Niederschlag wird auf glattem Filter filtriert, dann abgenutscht, 4mal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gedeckt, mit ca. 3 *l* gesättigter Ammonsulfatlösung verrieben. Durch Zusatz einer Mischung von 330 *cm*³ gesättigter Ammonsulfatlösung und 170 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure unter Umrühren wird der Niederschlag gelöst und durch Neutralisation mit ammonsulfatgesättigtem Ammoniak unter kräftigem Motorrühren der Niederschlag gefällt. Der Niederschlag wird filtriert, genutscht, 4mal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gedeckt, von der Nutsche heruntergenommen, mit Ammonsulfatlösung verrieben, wieder abgesaugt, 3mal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gedeckt. Der scharf abgesaugte Niederschlag wird mit ca. 2 *l* Wasser verrieben, unter Rühren durch allmählichen Zusatz von ca. 800 *cm*³ 20%iger Schwefelsäure gelöst. In die Flüssigkeit wird bei 18 bis 20° solange feingepulvertes Barythydrat eingetragen, bis ein geringer Überschuß desselben vorhanden ist. Zuletzt wird auf 40° erwärmt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen, von der Nutsche heruntergenommen, verrührt, wieder abgenutscht und mit Wasser ausgewaschen. Das mit den Waschwässern vereinigte Filtrat wird mit Ammonkarbonatlösung von der geringen Menge überschüssigen Barytes befreit.

Das Filtrat vom Baryumkarbonat wird im Vakuum eingeengt. Die weitere Verarbeitung geschieht wie die des Pepsinglutinpeptons, siehe Beispiel I. Bisweilen ist es hier nötig, die durch Lösen des durch Eindampfen im Vakuum erhaltenen Sirups gewonnene Lösung von Kristallen (Tryptophan) abzufiltrieren.

Name des Peptons	Einfachste aus den Analysen berechnete Formel	$\alpha_{[D]}^{20^0}$	$^0/_0$ Ba des Baryumsalzes	$\frac{CO_2}{N}$ bei der Carbaminoreaktion
Pepsinglutinpepton [1]	$C_{23}H_{39}N_7O_{10}$	— 81·5	10·7	1:7
Trypsinglutinpepton [2]	$C_{19}H_{30}N_6O_9$	— 100·0	12·4	—
Pepsinfibrinpepton [3]	$C_{21}H_{34}N_6O_9$	— 36·4	11·8	—
Trypsinfibrinpepton α [4]	$C_{10}H_{17}N_3O_5$	— 24·5	21·0	1:2·3
Trypsinfibrinpepton β [4]	$C_{11}H_{19}N_3O_5$	— 32·4	20·2	1:2·15

3. Die Prüfung auf Reinheit der Peptone.

Die Prüfung auf Reinheit geschieht:

a) durch Bestimmung des optischen Drehungsvermögens,

b) durch Bestimmung des Ba-Gehaltes der Baryumsalze,

c) durch Bestimmung des Quotienten $\frac{CO_2}{N}$ bei der Carbaminoreaktion.

d) durch Reaktionen.

Für die Prüfungen nach *a)* bis *c)* ist es erforderlich, die Peptone vor der Prüfung bis zum konstanten Gewichte zu trocknen. Hierbei ist zu berücksichtigen:

1. daß die Peptone beim Erhitzen bei Gegenwart von Alkohol teilweise verestern:

2. daß die Peptone zunächst teilweise als Ammonsalze gewonnen werden.

Wegen 1. ist es erforderlich, die Peptone, d. h. die auf Schiffchen abgewogenen, zur Untersuchung bestimmten Mengen, erst bei gewöhnlicher Temperatur 3—4 Tage im Vakuum über Schwefelsäure zu trocknen, damit

[1]) *W. Scheermesser,* Über Pepsinglutinpepton. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **41**. S. 68 (1904) und *M. Siegfried* und *H. Schmitz,* noch nicht veröffentlicht.

[2]) *Th. Richard Krüger,* Zur Kenntnis der tryptischen Verdauung des Leims. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 38. S. 320 (1903).

[3]) *Curt Borkel,* Über Pepsinfibrinpepton. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 38. S. 289 (1903).

[4]) *Fritz Müller,* Beiträge zur Kenntnis der Antipeptone. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 38. S. 265 (1903). *M. Siegfried* und *H. Liebermann.* Über die Bindung von Kohlensäure durch amphotere Aminokörper. IV. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **54**. S. 446 (1908).

der Alkohol, der auch dem scheinbar trockenen Pepton hartnäckig anhaftet, entweicht. Wegen 2. ist es nötig, auch für die Darstellung der Baryumsalze die Peptone auf Schiffchen bis zum konstanten Gewichte zu trocknen.

Das Trocknen geschieht in Schiffchen zunächst 3—4 Tage im Vakuum über Schwefelsäure, dann bei ca. 70°, am besten in einem durch konzentrierte Schwefelsäure getrockneten Luftstrome in einem Apparate, der durch siedenden Äthylalkohol erwärmt wird.[1]) Gewogen werden die Schiffchen in geschlossenen Glashüllen. Konstanz des Gewichtes wird angenommen, wenn innerhalb 48 Stunden keine größere Gewichtsabnahme als 0·0002 *g* erfolgt.

a) Die Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens.

Ca. 0·3 *g* bis zum konstanten Gewichte, wie angegeben, getrocknetes Pepton werden im 20 cm^3-Maßkolben gelöst. Die Polarisation geschieht bei 20° im 20 *cm*-Rohr in einem Apparate, der auf 0·01° genaue Einstellung gestattet, so daß bei scharfer Beobachtung der Fehler ± 0·005° beträgt. Bisweilen kommt es vor, daß auch reine Peptone eine zu hohe Drehung besitzen. In diesem Falle bewirkt das Berühren der Lösung mit einem in Essigsäure eingetauchten Glasstab das Zurückgehen der Drehung.

b) Die Bestimmung des Baryumgehaltes des Baryumsalzes.

Hierzu wird die zur Polarisation verwendete Lösung, vorausgesetzt, daß diese nicht mit Essigsäure berührt war, benutzt. Die Lösung wird mit etwas überschüssigem Barytwasser vermischt; bei gewöhnlicher Temperatur wird Kohlensäure eingeleitet, bis Lackmuspapier eben noch alkalisch reagiert, darauf wird schnell aufgekocht und filtriert, das Filtrat auf dem Wasserbade in gewogenem Platintiegel eingedampft, der Rückstand bei 70—80° bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Man erhält so das Gewicht des Baryumsalzes. Hierauf wird verkohlt, mit Schwefelsäure abgeraucht und aus dem Baryumsulfat das Baryum berechnet.

c) Die Bestimmung des Quotienten $\frac{CO_2}{N}$ bei der Carbaminoreaktion.[2])

Der Quotient $\frac{CO_2}{N}$ zeigt an, auf wieviel Atome Stickstoff des Peptons 1 Molekül Kohlensäure bei der Carbaminoreaktion aufgenommen wird.

Man löst vom Trypsinfibrinpepton ca. 0·3 *g*, vom Glutinpepton 1 *g* der im Trockenapparate bei ca. 70° bis zum konstanten Gewichte getrockneten Substanz in ca. 150—200 cm^3 Wasser. Zu der in Eiswasser abgekühlten Lösung gibt man einige Tropfen einer frisch bereiteten Lösung von Phenolphtalein in Kalkwasser und ca. 10 cm^3 einer ebenfalls abgekühlten

---

[1]) *M. Siegfried,* Über Kaseinokyrin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 50 (1904).

[2]) *M. Siegfried* und *C. Neumann,* Über die Bindung von Kohlensäure durch amphotere Aminokörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **54**. S. 424 (1908).

Kalkmilch (200 *g* Ätzkalk aus Marmor in 1 *l* Wasser). Unter stetem Umschwenken leitet man Kohlensäure ein, bis die rote Farbe des Indikators fast verschwunden ist, gibt 10 cm^3 Kalkmilch hinzu, leitet wieder, wie vorher, Kohlensäure bis zum Verblassen der roten Farbe ein, gibt wieder 10 cm^3 Kalkmilch hinzu, leitet wieder, wie vorher, Kohlensäure ein und schüttelt nach weiterem Zusatze von ca. 20 cm^3 Kalkmilch kräftig durch. Während des ganzen Versuches wird gut in Eiswasser gekühlt; als Reaktionsgefäß verwendet man vorteilhaft ein Pulverglas mit eingeschliffenem Glasstopfen. Hierauf wird auf einer kleinen Nutsche abgesaugt, das Filtrat, welches völlig klar sein muß, in einen ca. 1 *l* fassenden Erlenmeyer übergeführt und mit ca. 300 cm^3 ausgekochtem Wasser vermischt. Der Erlenmeyer wird sogleich mit einem Gummistopfen verschlossen, durch dessen Bohrung ein nach abwärts umgebogenes Natronkalkrohr geführt ist. Der Kolben wird zum Sieden erhitzt. Nach Erkalten wird auf bei 120° getrocknetem, gewogenem Gooch- oder bequemer Neubauertiegel abgesaugt, hierbei der Kolben sorgfältigst mit einem Gummiwischer von etwa anhaftendem Calciumkarbonat befreit. Nach Auswaschen mit kaltem Wasser wird der Tiegel bei etwa 120° getrocknet; die Gewichtszunahme gibt das gesuchte Gewicht Calciumkarbonat.

Das Filtrat vom Calciumkarbonat wird nach Zusatz von 20 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und etwas Kaliumsulfat im Kjeldahlkolben eingedampft und schließlich unter Zusatz von Kaliumpermanganat fertig kjeldahlisiert. Man erhält so die gesuchten Kubikzentimeter Säure.

Berechnung des Quotienten $\frac{CO_2}{N}$:

Setzt man den Quotienten $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{x}$, so gibt x an, wieviel Atome Stickstoff des Peptons auf ein Molekül aufgenommener und beim Kochen abgespaltener Kohlensäure kommen.

Die molekularen Mengen Kohlensäure und die atomistischen Mengen Stickstoff erhält man zunächst durch Division der absoluten Mengen Calciumkarbonat durch sein Molekulargewicht und der absoluten Mengen des Stickstoffs durch sein Atomgewicht, also:

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{g\ CaCO_3 : 100{\cdot}1}{g\ N : 14{\cdot}1} = \frac{g\ CaCO_3 : 100{\cdot}1}{cm^3\ \frac{n}{10}\text{-Säure} \times 0{\cdot}00141 : 14{\cdot}1}$$

$$= \frac{g\ CaCO_3 : 100{\cdot}1}{cm^3\ \frac{n}{10}\text{-Säure} \times 0{\cdot}0001}.$$

Dividiert man Zähler und Nenner durch die molekularen Mengen CO_2, so wird $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{x}$ und x gefunden durch den Bruch:

$$\frac{cm^3\ \frac{n}{10}\text{-Säure} \times 0{\cdot}0001}{g\ CaCO_3 : 100{\cdot}1}.$$

Da es für die Genauigkeit der Berechnung genügt, das Molekulargewicht des Calciumkarbonats = 100 zu setzen, so erhält man:

$$x = \frac{cm^3 \ \frac{n}{10}\text{-Säure} \times 0{\cdot}01}{g \ CaCO_3}.$$

Beispiel [0·3200 g angewandtes Pepton]:

Gefunden: $CaCO_3 = 0{\cdot}0805$ $cm^3 \ \frac{n}{10}$-Säure $= 19{\cdot}8$

$x = 2{\cdot}46$

d) Durch Reaktionen.

1. Die Peptone müssen auch nach dem Trocknen ganz klar in gesättigter Ammonsulfatlösung löslich sein. Diese Lösung darf nicht durch tropfenweisen Zusatz von ammonsulfatgesättigter verdünnter Schwefelsäure getrübt werden.

2. Die Peptone dürfen nicht beim Kochen mit Natronlauge unter Zusatz eines Tropfens Bleiacetatlösung (bei Verwendung von mehr Bleiacetat ist die Probe weniger empfindlich) eine Braun- bzw. Schwarzfärbung geben.

c) Methode zur Darstellung von Kyrinen.

Von **M. Siegfried**, Leipzig.

1. Definition der Kyrine.

Kyrine sind intermediäre Eiweißspaltungsprodukte, die durch Einwirkung von Säuren auf Proteinkörper oder Peptone entstehen, von ausgesprochenem basischem Charakter.

2. Darstellung von Kyrinsulfat.[1])

Beispiel: Darstellung von Kaseinokyrinsulfat.

0·5 *g* (fast) fettfreies Kasein nach *Hammarsten* von E. Merck in Darmstadt werden in einer 5—6 *l* fassenden Glasbüchse mit eingeschliffenem Stopfen mit 2·5 *l* 25%iger Salzsäure übergossen, durchgeschüttelt und bei gewöhnlicher Temperatur 1 Stunde quellen gelassen. Darauf werden 2 *l* Wasser dazu gegeben. Die Büchse wird 3 Wochen in den Brutschrank gestellt; täglich wird mindestens einmal umgeschüttelt.

Steht ein geeigneter Verdauungsapparat mit Rührwerk zur Verfügung, so wird die Zersetzung vorteilhaft in diesem vorgenommen.

Nach 3 Wochen wird die Mischung filtriert, das Filter mit 5 *l* Wasser nachgewaschen; das mit den Waschwässern vereinigte Filtrat wird unter kräftigem Umrühren mit Phosphorwolframsäure gefällt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Es werden ca. 2 *kg* Phosphorwolframsäure verbraucht, von der die erste Hälfte in ca. 10%iger wässeriger Lösung, die zweite in ca. 30%iger Lösung zugesetzt wird.

Die käufliche Phosphorwolframsäure ist vor der Verwendung nach *Drechsel* zu reinigen. Man schüttelt die konzentrierte wässerige Lösung der Säure zunächst direkt, dann nach Zusatz 50%iger Schwefelsäure aus. Die ätherische Lösung (Verbindung) der Phosphorwolframsäure setzt sich unten ab, wird, wenn sie ganz klar ist, abgelassen und allmählich in heißes Wasser eingegossen. Man erhält sogleich die wässerige Lösung der Phosphorwolframsäure.

---

[1]) *M. Siegfried,* Über Kaseinokyrin. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **43**. S. 46 (1904) und noch nicht veröffentlichte Untersuchungen.

Anderntags wird der Niederschlag abgenutscht und mit 5%iger Schwefelsäure Cl-frei gewaschen. Hierauf wird er mit ca. 3 *l* Wasser und 100 *cm*³ 10%igen Ammoniaks bei 40° verrührt; allmählich wird unter kräftigem Rühren soviel feingepulvertes Barythydrat eingetragen, bis eine filtrierte Probe immer noch einen geringen Niederschlag mit Barytwasser gibt. Es wird abgenutscht, der Niederschlag mit heißem Wasser ausgewaschen, das mit den Waschwässern vereinigte Filtrat mit kaltem Barytwasser vollständig ausgefällt. Das Filtrat von diesem Niederschlage wird durch etwas Ammonkarbonat vom geringen Barytüberschusse befreit, das Filtrat vom Baryumkarbonat solange mit konzentrierter, wässeriger Bleiacetatlösung versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Das fast farblose Filtrat vom Bleiniederschlage wird mit Schwefelwasserstoff entbleit, das Filtrat vom Bleisulfid auf dem Wasserbade bis zum dicken Sirup (200 *g*) eingedampft. Dieser wird mit einer Mischung von 60 *cm*³ Wasser und 60 *g* konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und in 10 *l* 99%igen Alkohols unter stetem Umrühren eintropfen gelassen; das ausgeschiedene schneeweiße Pulver wird abgesaugt, mit 99%igem Alkohol und wasserfreiem Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Das so gewonnene Sulfat wird in 150 *cm*³ 5%iger Schwefelsäure gelöst (sollte eine Trübung vorhanden sein, nach Absetzen derselben filtriert) und die Lösung in 10 *l* 99%igen Alkohols, wie oben, verrührt, das ausgeschiedene Sulfat wieder abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Dieses so umgefällte Sulfat wird in 130 *cm*³ 3%iger Schwefelsäure gelöst, in 8 *l* 99%igen Alkohols verrührt, abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Das so 2mal umgefällte Sulfat wird in 120 *cm*³ Wasser gelöst, die Lösung wird mit soviel Alkohol versetzt, bis die zuerst entstehende Trübung beim Umschütteln noch verschwindet und in 8 *l* 99%igen Alkohols verrührt. Die Ausbeute des, wie oben angegeben, abgesaugten, ausgewaschenen und über Schwefelsäure getrockneten Sulfates beträgt ca. 56 *g*, auf bis zum konstanten Gewichte bei ca. 95° getrocknetes Sulfat berechnet: ca. 47 *g*. (Tabelle siehe S. 544.)

3. Reinheitsprüfung des Kaseinokyrinsulfates.

1. Das Sulfat ist klar in Wasser löslich.

2. Das Phosphorwolframat ist nach dem Trocknen auf dem Wasserbade in 80%igem Alkohol völlig löslich.

3. Die wässerige Lösung des Kyrins, aus Sulfat durch Barytwasser und Ammonkarbonat und Eindampfen auf dem Wasserbade dargestellt, schwach mit Jodwasserstoffsäure angesäuert, gibt auf tropfenweisen Zusatz von Kaliumquecksilberjodid keine Fällung.

4. Elementaranalyse.

Tabelle der Kyrinsulfate.

	Zusammensetzung				% des durch Phosphorwolframsäure fällbaren N der Spaltungsprodukte vom Gesamt-N
	C	H	N	S	
Kaseinokyrinsulfat [1]	31·8	6·1	14·7	11·6	85
Glutokyrinsulfat α [2]	31·9	5·6	16·0	10·1	66·7
Glutokyrinsulfat β [3]	32·5	5·8	17·2	10·0	87
Fibrinokyrinsulfat [4]	33·5	6·3	15·3	10·0	73
Globinokyrinsulfat [5]	34·3	6·0	15·1	11·0	76

[1]) *M. Siegfried,* Über Kaseinokyrin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 47 (1904). — Derselbe, Zur Kenntnis der Kyrine. Ebenda. Bd. 48. S. 54 (1906). — Derselbe, Über Kaseinokyrin. III. Mitteilung. Ebenda. Bd. **50**. S. 163 (1906).

[2]) *M. Siegfried,* Zur Kenntnis der Hydrolyse des Eiweißes. Ber. d. math.-phys. Klasse. d. Königl. Sächs. Ges. d. Wissensch. 1903. S. 63.

[3]) *M. Siegfried* und *O. Pilz,* Zur Kenntnis der allmählichen Hydrolyse des Glutins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 58. S. 215 (1908).

[4]) *M. Siegfried,* Zur Kenntnis der Kyrine. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 67 (1906).

[5]) *Hugo Kirbach,* Zur Kenntnis der allmählichen Hydrolyse des Pferdeoxyhämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **50**. S. 129 (1906).

Methoden zur Synthese von Polypeptiden.

Von **Emil Abderhalden,** Berlin.

Die älteste Methode zur Darstellung von Polypeptiden ist die Bildung von Dipeptiden aus den 2·5-Diketopiperazinen. Diese bilden sich sehr leicht aus den Estern der Aminosäuren. Es gilt dies vor allem für die einfacheren Monoaminosäuren. Aus Glykokollester entsteht z. B. Glycinanhydrid. Dieses läßt sich nun durch Einwirkung von Salzsäure, am besten aber von verdünntem Alkali, in das entsprechende Dipeptid, in diesem Falle Glycyl-glycin aufspalten:

$$\underbrace{NH\langle\begin{matrix}CH_2 . CO\\ CO . CH_2\end{matrix}\rangle NH}_{\text{Glycinanhydrid}} + H_2O = \underbrace{NH_2 . CH_2 . CO . NH . CH_2 . COOH.}_{\text{Glycyl-glycin}}$$

Diese Methode zur Darstellung von Polypeptiden hat einen nur sehr beschränkten Wert. Einmal führt sie nur zu Dipeptiden, und dann macht die Aufspaltung der 2·5-Diketopiperazine der höheren Aminosäuren Schwierigkeiten. Ein weiterer Übelstand zeigt sich bei der Spaltung gemischter Diketopiperazine, d. h. von solchen Anhydriden, die zwei verschiedene Aminosäuren enthalten, wie das folgende Beispiel zeigt. Glycyl-alaninanhydrid

$$NH\langle\begin{matrix}CH_2 . CO \quad II\\ CO . CH . CH_3\end{matrix}\rangle NH \quad I$$

Glycyl-alanin-anhydrid.

entspricht zwei Dipeptiden, einmal Glycyl-alanin und ferner Alanyl-glycin. Beide können aus dem genannten Anhydrid entstehen, und zwar ersteres, wenn die Spaltung bei I erfolgt und letzteres, wenn sie bei II eintritt. In der Tat erhält man auch bei der Aufspaltung von Glycyl-alaninanhydrid sowohl Glycyl-alanin als auch Alanyl-glycin, also ein Gemisch, das sich recht schwer trennen läßt. Zu dieser Schwierigkeit kommt noch hinzu, daß bei der Aufspaltung optisch-aktiver Anhydride durch Alkali die Gefahr einer teilweisen Razemisierung nicht ausgeschlossen ist.

In ihrer Anwendung einstweilen beschränkt geblieben ist eine zweite, aussichtsvolle Methode, nämlich die Synthese von Polypeptiden mittelst der Ester. Sie gründet sich auf die auch bei den Estern der höheren Polypeptide noch vorhandene Neigung, Alkohol abzuspalten. Wird z. B. der Methylester des Diglycyl-glycins auf 100° erwärmt, so erhält man den Methylester von Pentaglycyl-glycin und durch dessen Verseifung das Hexapeptid selbst.

$$2\,NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOCH_3 = CH_3OH + NH_2.CH_2.CO.(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.COOCH_3.$$

Die meiste Anwendung hat bis jetzt die folgende Methode zur Darstellung von Polypeptiden gefunden. Sie beruht auf der Kuppelung von Aminosäuren und von Polypeptiden mit Halogenacylverbindungen. Als einfachstes Beispiel dieser Art von Polypeptidsynthesen sei die Bildung von Glycyl-glycin aus Glykokoll und Chloracetylchlorid und nachträglicher Einwirkung von Ammoniak auf das zunächst entstehende Chloracetyl-glycin erwähnt.

$$\underbrace{Cl.CH_2.COCl}_{\text{Chloracetyl-chlorid}} + \underbrace{NH_2.CH_2.COOH}_{\text{Glycin}} = \underbrace{Cl.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH}_{\text{Chloracetyl-glycin}} + HCl.$$

$$\underbrace{Cl.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH}_{\text{Chloracetyl-glycin}} + 2\,NH_3 = \underbrace{NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH}_{\text{Glycyl-glycin}} + NH_4Cl.$$

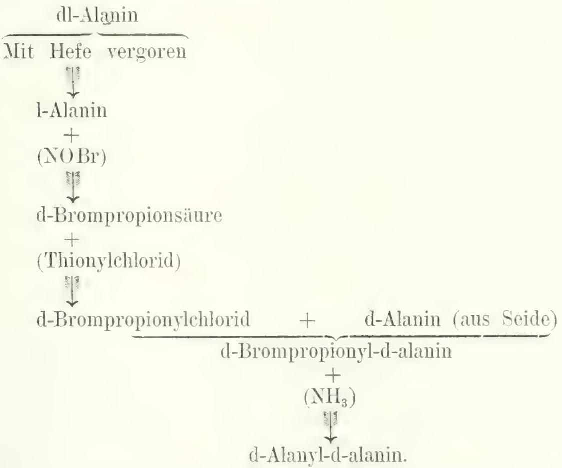
In ganz gleicher Weise lassen sich auch Dipeptide mit anderen Aminosäuren darstellen unter Anwendung der entsprechenden Halogenacylverbindungen, so dient zur Einführung von Alanyl Brompropionylbromid, zur Einführung von Leucyl α-Bromisocapronylchlorid, zur Einführung von Phenyl-alanyl α-Brom-hydrozimtsäurechlorid, von Prolyl $\alpha.\delta$-Dibrom-valerylchlorid etc.

In entsprechender Weise kann ein Dipeptid in ein Tripeptid und ein solches in ein Tetrapeptid etc. übergeführt werden. Es lassen sich auf diesem Wege lange Polypeptidketten mit den verschiedenartigsten Aminosäuren darstellen.

Die genannte Methode hat auch dazu gedient, um optisch-aktive Polypeptide zu gewinnen. Am einfachsten liegt der Fall bei der Einführung von Glycyl. Das entsprechende optisch-aktive Polypeptid wird durch Kuppelung der optisch-aktiven Aminosäure mit Chloracetylchlorid erhalten. Durch Einwirkung von Ammoniak entsteht dann das Dipeptid. So sind z. B. Glycyl-l-tyrosin und Diglycyl-cystin erhalten worden.

Viel größere Schwierigkeiten bietet die Einführung von optisch-aktiven Halogenacylen. Diese werden aus optisch-aktiven Aminosäuren gewonnen. Die Methode der Synthese optisch-aktiver Polypeptide mittelst optisch-aktiver Halogenacyle sei an einem Beispiel erläutert. Zur Darstellung

von d-Alanyl-d-alanin werden d-Alanin und l-Alanin verwendet. Letzteres wird aus dl-Alanin am besten nach der Methode von *Ehrlich* durch Vergärung mit Hefe dargestellt. Durch Einwirkung von Stickoxyd und Brom erhält man aus l-Alanin d-Brompropionsäure. Diese läßt sich nun leicht in das Chlorid verwandeln. Durch Kuppelung von d-Alanin mit dem so erhaltenen d-Brompropionylchlorid erhält man zunächst d-Brompropionyl-d-alanin und hieraus durch Einwirkung von Ammoniak d-Alanyl-d-alanin. In ganz gleicher Weise lassen sich auch die meisten der übrigen Aminosäuren einführen. Verwendet man zur Spaltung der razemischen Aminosäuren nicht eine biologische Methode, wobei stets die in der Natur vorkommende Komponente des Razemkörpers verloren geht, sondern eine chemische, z. B. die Spaltung der Formyl- oder Benzoylverbindung der razemischen Aminosäure mit Hilfe eines Alkaloidsalzes, dann kann man in vielen Fällen beide Komponenten zur Synthese verwenden, und zwar die in der Natur vorkommende Komponente direkt und den Antipoden durch Überführung in die entsprechende Bromfettsäure mit Hilfe von Nitrosylbromid, nachfolgende Chlorierung und Kuppelung. Die folgende Übersicht soll die Synthese von d-Alanyl-d-alanin veranschaulichen:



Durch die Methode der Synthese von Polypeptiden mittelst der Halogenacylverbindungen ist es nicht möglich, die Polypeptidkette auf der Seite des Karboxyls zu verlängern, ein Umstand, der für die Darstellung vieler Kombinationen hindernd ist. Diese Schwierigkeit wurde durch die Beobachtung *Emil Fischers* beseitigt, daß die Polypeptide resp. deren Halogenacylverbindungen sich chlorieren lassen. So erhielt *Emil Fischer* bei der Behandlung von α-Bromisocapronyl-glycin mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid das entsprechende Chlorid: $C_4H_9 . CHBr . CO . NHCH_2 COCl$.

Diese Verbindung läßt sich nun mit den Estern von Aminosäuren und vor allem auch mit Polypeptiden kuppeln. Läßt man z. B. auf das genannte Produkt Glycin-äthylester einwirken, dann erhält man:

$$C_4H_9 . CHBr . CO . NHCH_2CO . NHCH_2COOC_2H_5.$$

Nimmt man an Stelle des Glykokollesters Glycyl-glycinäthylester, so resultiert:

$$C_4H_9 . CHBr . CO . NHCH_2CO . NHCH_2CO . NHCH_2COOC_2H_5.$$

Beide Verbindungen lassen sich leicht verseifen, und durch Einwirkung von Ammoniak gelangt man dann zu den entsprechenden Polypeptiden, also in dem einen Falle zu Leucyl-glycyl-glycin und im anderen Falle zu dem Tetrapeptid Leucyl-diglycyl-glycin.

Von ganz besonderer Wichtigkeit ist es, daß die Chlorierung auch bei den Aminosäuren selbst ausführbar ist. So ist es möglich, z. B. zwei optisch-aktive Aminosäuren ohne den Umweg über die entsprechende Bromfettsäure und deren Chlorierung zu kuppeln. d-Alanyl-d-alanin läßt sich nach dieser Methode aus d-Alanin in folgender Weise darstellen. d-Alanin wird mit Phosphorpentachlorid und Acetylchlorid in das Chlorid verwandelt und nun direkt mit d-Alaninester gekuppelt. Durch Verseifung des entstehenden Dipeptidesters wird sofort das freie und optisch-aktive Dipeptid erhalten.

Im Anschluß an diese Übersicht der zur Synthese von Polypeptiden vorhandenen Methoden seien einige Beispiele[1]) angeführt.

1. Bildung von Dipeptiden durch Aufspaltung von Anhydriden.

Die Darstellung von Diketopiperazinen ist bei den verschiedenen Aminosäuren eine verschieden leichte. Bei den einfacheren Aminosäuren genügt das Stehenlassen ihrer Ester. Besonders einfach ist die Gewinnung des Glycinanhydrids.[2]) Es werden zu seiner Darstellung z. B. 560 *g* Glykokollesterchlorhydrat in einem dickwandigen Becherglase mit 280 cm^3 Wasser übergossen. Das Gemisch wird in einer Kältemischung gut gekühlt. Nun werden unter kräftigem Turbinieren 320 cm^3 11·5fach n-Natronlauge im Laufe von einigen Stunden zugetropft, wobei die Temperatur der Flüssigkeit nicht über —5° steigen soll. Das Esterchlorhydrat geht allmählich in Lösung, während etwas Kochsalz ausfällt. Dann läßt man, nachdem die Lauge ganz eingetragen worden ist, die Flüssigkeit bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Schon nach einigen Stunden beginnt die Abscheidung von Glycinanhydrid. Nach 24 Stunden ist die Kristallisation gewöhnlich beendet. Man kühlt nunmehr stark ab und nutscht den Kristallbrei ab. Das zugleich ausgefallene Kochsalz wird durch Waschen des Filterrückstandes mit eiskaltem Wasser entfernt und nunmehr das rohe Glycinanhydrid aus

[1]) Sie sind alle den an Ort und Stelle zitierten Arbeiten von *Emil Fischer* entnommen und zum größten Teil wörtlich wiedergegeben.

[2]) *Emil Fischer*, Synthese von Polypeptiden. XV. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **39**. S. 930 (1906).

der 6fachen Menge heißen Wassers unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert. Ausbeute ca. 100 *g*.

Zur Aufspaltung des Glycinanhydrids verwendet man Alkali.[1]) 1 *g* fein gepulvertes Glycinanhydrid wird mit 10 *cm*³ n-Natronlauge (berechnet für 1 Mol. 8·8 *cm*³) bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt. Es geht rasch in Lösung und nach ca. 20 Minuten ist die Umwandlung in Glycyl-glycin vollzogen. Man neutralisiert nun mit 10 *cm*³ n-Salzsäure, dampft unter vermindertem Druck auf wenige Kubikzentimeter ein und läßt nun das Glycyl-glycin auskristallisieren.

Erwähnt sei, daß man Glycinanhydrid direkt zur Kuppelung mit Halogenacylchloriden verwenden kann. Es spaltet sich während der Operation auf, und man erhält bei Verwendung von z. B. Chloracetylchlorid Chloracetyl-glycyl-glycin.

Zur Isolierung mancher aus Anhydriden gewonnenen Dipeptide wird mit Vorteil zur Neutralisation des Alkalis n-Jodwasserstoffsäure verwendet. Es gilt dies für Dipeptide, die in Wasser leicht löslich, dagegen in absolutem Alkohol unlöslich sind. Es wird dann nach dem Eindampfen der Flüssigkeit der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht und das gebildete Jodnatrium so entfernt. Zurück bleibt das reine Dipeptid in sehr guter Ausbeute.

Wir haben schon hervorgehoben, daß diese Methode im allgemeinen zur Darstellung von Dipeptiden nicht sehr vorteilhaft ist. Ein ganz besonderer Nachteil ist vor allem der, daß die Anhydride der höheren Aminosäuren, so z. B. Leucinimid, nur sehr schwer aufspaltbar sind und ganz besonders muß hervorgehoben werden, daß optisch-aktive Anhydride bei der Aufspaltung mit Alkali ganz beträchtlich razemisierte Dipeptide liefern.

2. Synthese von Polypeptiden mit Hilfe von Halogenacylchloriden.

a) Darstellung razemischer Polypeptide. Beispiel: dl-Leucyl-glycin.[2])

10 *g* Glykokoll werden in 133 *cm*³ (1 Mol.) n-Natronlauge gelöst und unter kräftigem Schütteln abwechselnd 220 *cm*³ n-Natronlauge und 34 *g* (1·2 Mol.) α-Bromisocapronylchlorid portionenweise zugesetzt. Es wird erst dann mit der Zugabe fortgefahren, wenn der Säurechloridgeruch verschwunden ist. Am besten läßt man die Lauge und das Säurechlorid aus Büretten zufließen. Der ganze Prozeß ist nach etwa 45 Minuten beendet. Die Flüssigkeit wird nunmehr mit 45 *cm*³ fünffach normaler Salzsäure versetzt, das ausfallende Öl in Äther aufgenommen und die eingeengte ätherische Lösung mit Petroläther gefällt. Das ausfallende Öl erstarrt bald kristallinisch. Das

[1]) *Emil Fischer*, Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 38. S. 605 (1905).

[2]) *Emil Fischer* (und *A. Brunner*), Synthese von Polypeptiden. XI. Leucyl-glycin und Alanyl-leucyl-glycin. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. 340. S. 123 ff. (1905).

so erhaltene Bromisocapronyl-glycin wird aus heißem Chloroform oder Toluol umkristallisiert.

Der Bromkörper wird dann in 25⁰/₀igem wässerigem Ammoniak gelöst und die Lösung 3 Tage bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Nun wird unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand zur Entfernung des entstandenen Bromammons mit absolutem Alkohol ausgekocht und schließlich das halogenfreie Leucyl-glycin aus der 15fachen Menge heißen Wassers umkristallisiert.

In gleicher Weise gestaltet sich die Synthese, wenn optisch-inaktive Halogenacylchloride mit optisch-aktiven Aminosäuren gekuppelt werden und auch bei Verwendung von optisch-aktiven Halogenacylchloriden erfährt die Methode keine Änderung. In manchen Fällen ist es vorteilhafter, an Stelle der freien Aminosäure ihren Ester zu benutzen. Als Beispiel einer solchen Synthese sei diejenige des Glycyl-l-tyrosins angeführt.

b) Darstellung von optisch-aktiven Polypeptiden.

α) Kuppelung von optisch-aktiven Aminosäuren mit optisch-inaktivem Halogenacylchlorid. Beispiel: Synthese von Glycyl-l-tyrosin.[1])

10 *g* salzsaurer l-Tyrosinester werden mit 100 *cm*³ Chloroform übergossen und nach dem Abkühlen auf 0⁰ mit 41 *cm*³ n-Natronlauge (1 Mol.) unter Schütteln versetzt. Der in Freiheit gesetzte Ester geht rasch in das Chloroform über. Ferner werden 5 *g* Chloracetylchlorid (statt der berechneten 4·6 *g*) mit 50 *cm*³ Chloroform verdünnt und die Hälfte dieser Lösung zu obiger Mischung zugefügt. Es vollzieht sich nun im Chloroform die beabsichtigte Reaktion. Um den hierbei wiederum entstehenden salzsauren l-Tyrosinester noch nutzbar zu machen, werden jetzt zu der gekühlten Mischung unter Schütteln abwechselnd 20 *cm*³ einer Natriumkarbonatlösung, die 4·7 *g* des trockenen Salzes enthält, und der Rest der obigen Chloroformlösung des Chloracetylchlorids zugegeben. Zum Schluß wird das Chloroform abgehoben, mit Natriumsulfat getrocknet, auf dem Wasserbade sehr stark eingedampft und dann der Chloracetyl-l-tyrosinester durch Petroläther gefällt. Zur Verseifung des Esters werden 10 *g* davon in 70 *cm*³ n-Natronlauge (2 Mol.) gelöst und nach ¼ Stunde die äquivalente Menge Salzsäure hinzugefügt. Nach kurzer Zeit kristallisiert das Chloracetyl-l-tyrosin aus. Es wird durch dreitägiges Stehenlassen mit 25⁰/₀igem wässerigem Ammoniak in Glycyl-l-tyrosin übergeführt.

β) Kuppelung von optisch-aktiven Aminosäuren mit optisch-aktivem Halogenacylchlorid.

Um zu optisch-aktiven Halogenacylchloriden zu gelangen, waren besondere Methoden nötig, wie wir bereits in der Einleitung angeführt haben. Die wichtigste Methode sei an Hand eines Beispiels, nämlich der Darstellung

---

[1]) *Emil Fischer,* Synthese von Polypeptiden. II. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **37.** S. 2486 (1904).

von d-Bromisocapronylchlorid, geschildert.[1]) Als Ausgangsmaterial dient d-Leucin oder Formyl-d-leucin. 10 *g* der letzteren Verbindung werden mit 45 cm^3 20%iger Bromwasserstoffsäure eine Stunde am Rückflußkühler gekocht, wobei völlige Hydrolyse eintritt. Man verdampft dann die Flüssigkeit bei 15—20 *mm* Druck bis zur Trockene, löst den Rückstand in 25 cm^3 20%iger Bromwasserstoffsäure, fügt 15 *g* Brom zu, kühlt unter 0° und leitet unter fortwährender weiterer Kühlung 3 Stunden einen ziemlich starken Strom von Stickoxyd ein. Dann fügt man nochmals 6 *g* Brom zu und setzt das Einleiten des Stickoxyds noch 2 Stunden fort. Es scheidet sich hierbei die Bromisocapronsäure ölig ab.

Zum Schlusse wird 10—15 Minuten lang ein kräftiger Luftstrom durch die Flüssigkeit getrieben, um den größten Teil des unveränderten Broms zu entfernen, dann wird etwa die 5fache Menge Äther zugefügt, der Rest des Broms durch schweflige Säure reduziert, die ätherische Lösung abgehoben, mit Wasser sorgfältig gewaschen, mit Chlorcalcium kurze Zeit getrocknet, schließlich der Äther verdampft und die Bromisocapronsäure unter sehr geringem Druck destilliert. Bei 0·3 *mm* geht der allergrößte Teil zwischen 90 und 92° über. Es bleibt nur ein geringer, dunkelbrauner Rückstand.

Umwandlung der d-Bromisocapronsäure in d-Bromisocapronylchlorid. 25 *g* frisches und ganz rasch zerkleinertes Phosphorpentachlorid (1·2 Mol.) werden in einem Gefäß mit Glasstopfen durch eine Kältemischung sorgfältig abgekühlt und dazu 20 *g* d-Bromisocapronsäure zugegeben. Es findet sofort eine lebhafte Entwicklung von Salzsäure statt. Später ist es nötig, die Masse ¹/₄ Stunde zu schütteln, zuletzt bei gewöhnlicher Temperatur, um eine völlige Umsetzung herbeizuführen; dann kühlt man wieder stark, um den Überschuß des Phosphorpentachlorids in fester Form abzuscheiden, fügt jetzt das gleiche Volumen über Natrium getrockneten Äther hinzu, filtriert von dem Phosphorpentachlorid in einen Fraktionierkolben, verdunstet den Äther unter 15—20 *mm* Druck und schließlich das Phosphoroxychlorid unter 0·5 *mm* Druck bei gewöhnlicher Temperatur. Das zurückbleibende d-Bromisocapronylchlorid wird schließlich bei demselben Druck destilliert. Bei 0·5 *mm* Druck geht es bei 40—42° über.

Das d-Bromisocapronylchlorid kann nun mit einer Aminosäure in genau der gleichen Weise gekuppelt werden, wie wir es bei der Synthese des dl-Leucyl-glycins geschildert haben.

In ganz analoger Weise läßt sich aus l-Alanin d-Brompropionsäure und daraus d-Brompropionylchlorid gewinnen.[2]) Die Vorschrift für die Darstellung dieses Chlorids sei ihrer Wichtigkeit wegen kurz angeführt.

---

[1]) *Emil Fischer*, Synthese von Polypeptiden. XV. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **39**. S. 2929 (1906).

[2]) *Emil Fischer* (und *Otto Warburg*), Synthese von Polypeptiden. XI. Optisch-aktive α-Brompropionsäure. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **340**. S. 123 (1905). — Vgl. ferner: *Emil Fischer* und *Karl Raske*, Beitrag zur Stereochemie der 2·5-Diketopiperazine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **39**. S. 3995 (1906).

Darstellung von d-Brompropionylchlorid. 5 *g* l-Alanin werden mit einem Gemisch von 55 *g* konzentrierter Schwefelsäure und 15 *cm*³ Wasser übergossen und dazu unter Kühlung in einer Kältemischung 75 *g* Bromkali und 12 *g* Brom gegeben. In das mit Eis gekühlte Gemisch leitet man 3 Stunden einen kräftigen Strom von Stickoxyd, gibt dann wieder 4 *g* Brom zu und setzt das Einleiten des Gases noch 2 Stunden fort. Um die Hauptmenge des Broms zu entfernen, wird Luft durch die Flüssigkeit geleitet und der Rest des Broms durch Versetzen mit schwefliger Säure entfernt, dann die Brompropionsäure mit Äther ausgeschüttelt, die mit Chlorcalcium getrocknete ätherische Lösung verdunstet und der Rückstand bei 0·1 *mm* Druck destilliert. Die Umwandlung der d-Brompropionsäure in das Chlorid erfolgt in der gleichen Weise, wie es oben für die d-Bromisocapronsäure beschrieben worden ist.

3. Darstellung der Chloride von Aminosäuren und von Polypeptiden und deren Verwendung zur Synthese.[1, 2])

α) Chlorierung einer Aminosäure:

Beispiel: Salzsaures Leucylchlorid[1]), $C_4H_9 . CH (NH_3Cl) . COCl$.

Reines l-Leucin[3]) wird sorgfältig gepulvert, durch ein feines Sieb getrieben und völlig getrocknet. 5 *g* werden mit 100 *cm*³ frischem Acetylchlorid in einem Glaszylinder von 200 *cm*³ mit gut schließendem Glasstöpsel übergossen, abgekühlt, dann 8 *g* (1 Mol.) frisches und rasch zerkleinertes Phosphorpentachlorid zugegeben und 2 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur auf der Maschine geschüttelt. Der Chlorphosphor verschwindet dabei völlig, und die Aminosäure verwandelt sich in das salzsaure Chlorid, das die Flüssigkeit als sehr feiner, dicker, aber kristallinischer Brei erfüllt. Zur Isolierung des Produktes ist nur noch Filtration und Auswaschen mit Acetylchlorid und Petroläther nötig. Dabei muß Feuchtigkeit völlig ausgeschlossen sein. Da die sehr lockere Masse wegen Verstopfung des Filters schlecht zu filtrieren ist, so ist es vorteilhaft, den folgenden, von *Emil Fischer* angegebenen Apparat zu benützen (Fig. 44).

a ist der Stöpselzylinder, in welchem die Reaktion vorgenommen wird, und *b* der Tonzylinder, in den mittelst eines Gummistopfens das Rohr *c*, das fast bis zum Boden reicht, eingesetzt ist. Die Flasche *a* ist mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen, durch den einerseits das Rohr *c* und andrerseits das Rohr *d* durchgehen. *d* verzweigt sich in *e* und *f*, die beide mit Glashähnen versehen sind; *f* dient dazu, die Waschflüssigkeit aus der Flasche *g* zu entnehmen. *e* führt zu dem mit Phosphorsäureanhydrid gefüllten Turm *h* und der mit Schwefelsäure gefüllten Flasche *i*, die dazu

¹) Vgl. hierzu: *Emil Fischer*, Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 38. S. 605 (1905).

²) *Emil Fischer*, Synthese von Polypeptiden. XIII. Chloride der Aminosäuren und Polypeptide und ihre Verwendung zur Synthese. Ebenda. Jg. 38. S. 2914 (1905).

³) In der Originalarbeit von *Emil Fischer* ist die Methode für salzsaures dl-Leucinchlorid beschrieben.

dienen, einen trockenen Luftstrom in *a* hineinzuleiten. Das Rohr *c* steht durch den Gummischlauch *k* mit der Saugflasche *l* in Verbindung. Wird bei *l* evakuiert, so geht die in der Flasche *a* enthaltene Flüssigkeit durch die Tonzelle und das Rohr *c* dorthin. Gleichzeitig läßt man durch *e* einen langsamen, getrockneten Luftstrom in das Gefäß eintreten. Der größte Teil des Niederschlags setzt sich fest an die Tonzelle an. Um zu waschen, schließt man den Hahn bei *e* und öffnet bei *f*, worauf die Waschflüssigkeit aus der Flasche *g* nach *a* übertritt. *g* enthält frisches Acetylchlorid, sie wird später durch eine andere mit Petroläther, der über Phosphorsäureanhydrid getrocknet ist, ersetzt. Damit das Übersteigen der Waschflüssigkeit erleichtert wird, ist es ratsam, die Flasche *a*, in der bei der hohen Tension der verwendeten Flüssigkeit nur sehr geringer Minderdruck herrscht, durch Einstellen in eine Kältemischung oder durch Aufspritzen von Äther momentan abzukühlen. Noch bequemer wird die Operation, wenn in die Flasche *a* ein

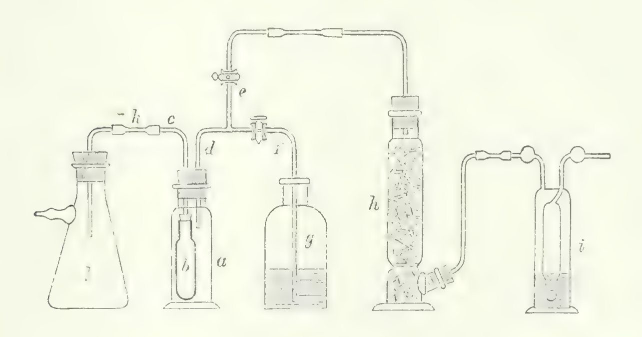


Fig. 44.

drittes, in der Zeichnung fehlendes Rohr mit Hahn einmündet, das direkt mit der Saugpumpe verbunden werden kann. Einmaliges Waschen mit so viel Acetylchlorid, daß die Flasche *a* bis zur Höhe des Niederschlages damit gefüllt ist, und zweimaliges Waschen mit der gleichen Menge Petroläther genügen, um ein analysenreines Präparat zu gewinnen. Zum Schluß wird scharf abgesogen unter gleichzeitigem Zutritt des getrockneten Luftstromes, dann der Niederschlag möglichst rasch in einen mit Phosphorpentoxyd beschickten Vakuumexsikkator übergeführt und hier etwa 1 Stunde zur Entfernung der letzten Reste des Petroläthers getrocknet. Das erhaltene salzsaure l-Leucylchlorid kann nun direkt zur Kuppelung mit Aminosäuren und mit Polypeptiden verwendet werden. Ebenso können in genau der gleichen Weise auch Polypeptide chloriert werden.

Von großem Interesse ist die Beobachtung, daß die Art der Gewinnung der Aminosäuren und der Polypeptide von größter Bedeutung für den Erfolg der Chlorierung ist. So gelang es nicht, aus Wasser kristallisiertes

Glykokoll in das salzsaure Salz zu verwandeln, wurde das Glycin dagegen in wenig warmem Wasser gelöst und mit einem großen Überschuß von Alkohol gefällt, so ließ sich das fein pulverisierte Glycin sehr leicht chlorieren.

β) Synthese von Polypeptiden mittelst der Chloride von Aminosäuren:

Die salzsauren Aminosäurechloride und die salzsauren Chloride der Polypeptide lassen sich direkt mit Aminosäuren und Polypeptiden kuppeln. Als Beispiel einer derartigen Synthese sei diejenige des d-Alanyl-glycins angeführt:

5·8 *g* salzsaures d-Alanylchlorid werden in eine auf 0° gekühlte Lösung von 8 *g* Glykokollester, der durch Baryumoxyd sorgfältig getrocknet war, in 80 cm^3 trockenem Chloroform in 5 Portionen eingetragen. Beim jedesmaligen kräftigen Schütteln geht das Chlorid fast völlig in Lösung. Die Mischung bleibt dann bei Zimmertemperatur eine Stunde stehen, wobei manchmal Kristallisation des salzsauren Glykokollesters eintritt. Sie wird nun ohne Filtration unter stark vermindertem Druck verdampft, der Rückstand zuerst mit Petroläther gewaschen, dann in 50 cm^3 Methylalkohol gelöst und in einer kleinen Menge der abgemessenen Flüssigkeit das Chlor maßanalytisch bestimmt. Zu dem Hauptteil der Lösung fügt man nun die für das Chlor berechnete Menge einer verdünnten Natriummethylatlösung.

Nach einstündigem Stehen bei 0° wird das Kochsalz abfiltriert, die Flüssigkeit unter geringem Druck verdampft und der Rückstand wieder zur Entfernung des freien Glykokollesters mit Petroläther mehrmals sorgfältig gewaschen, dann mit 5 cm^3 absolutem Alkohol aufgenommen und die vom Kochsalz abfiltrierte Lösung mit Äther und viel Petroläther versetzt. Hierbei scheidet sich ein Öl ab, das nach einstündigem Stehen von der Lösung getrennt und zur Verseifung in 40 cm^3 kalter Normalnatronlauge gelöst wird. Die Flüssigkeit bleibt $1^1/_2$ Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wird dann nach Zusatz von 40 cm^3 Normalschwefelsäure unter vermindertem Druck stark eingedampft und zur Fällung des Natriumsulfats mit dem 5fachen Volumen heißen Alkohols vermischt. Die heiß filtrierte Flüssigkeit scheidet beim Eindampfen auf dem Wasserbade schon in der Wärme das d-Alanylglycin kristallinisch ab.

γ) Spaltung razemischer Aminosäuren in ihre Komponenten:

Zur Darstellung der optisch-aktiven Polypeptide bedarf es ganz reiner, optisch-aktiver Aminosäuren. Manche davon lassen sich aus Proteinen gewinnen. Wir haben an anderer Stelle (S. 490) die zu ihrer Darstellung dienenden Methoden angeführt. Einige Aminosäuren lassen sich aus den Spaltprodukten eines vollständig hydrolysierten Proteins entweder nur schwer reinigen, oder aber sie kommen in sehr geringen Mengen vor, sehr häufig sind sie auch zum Teil razemisiert. Es lassen sich ferner nicht alle Aminosäuren gleich gut in das Chlorid umwandeln, so daß der Synthese von optisch-aktiven Polypeptiden in manchen Fällen eine Grenze gesetzt wäre, wenn sie nur auf die Chloride der Aminosäuren zur Einführung neuer optisch-aktiver Bausteine angewiesen wäre. Wie bereits erwähnt worden ist,

hat *Emil Fischer* durch die Darstellung optisch-aktiver Halogenacylchloride eine weitere, sehr fruchtbare Methode zur Polypeptidsynthese geschaffen, und zwar kann zu deren Gewinnung, wie oben erwähnt, sehr oft diejenige optisch-aktive Form der Aminosäure verwendet werden, die in der Natur nicht vorkommt. Wir brauchen somit in vielen Fällen beide optisch-aktiven Formen der einzelnen Aminosäuren. Sie lassen sich verhältnismäßig leicht aus den synthetisch dargestellten, optisch-inaktiven Aminosäuren durch Spaltung gewinnen.[1]) Als Beispiel einer solchen Zerlegung einer razemischen Aminosäure in ihre Komponenten sei die Spaltung des dl-Leucins angeführt:

Zunächst wird die Benzoylverbindung des dl-Leucins dargestellt, und zwar nach dem folgenden Beispiel:

20 *g* dl-Leucin werden in 153 *cm*³ (1 Mol.) Normalnatronlauge und 400 *cm*³ Wasser gelöst, hierzu 76 *g* Natriumbikarbonat gegeben und 64 *g* Benzoylchlorid in kleinen Portionen eingetragen. Nach jedesmaligem Zusatz des Chlorids wird heftig geschüttelt, bis der Geruch verschwunden ist. Die Operation dauert 4 Stunden. Zum Schluß ist die Flüssigkeit durch eine geringe Menge eines Öles getrübt. Sie wird deshalb mit wenig Tierkohle geschüttelt, filtriert, mit einem Überschuß von Schwefelsäure versetzt und der Kristallbrei, nach zweistündigem Stehen in Eis, filtriert. Das Gemisch von Benzoësäure und Benzoylleucin wird in dünner Schicht ausgebreitet und an der Luft getrocknet und dann zur Entfernung der Benzoësäure wiederholt mit größeren Mengen Ligroïn (Siedepunkt 65—72°) ausgekocht. Der Rückstand löst sich in etwa 20 Teilen warmem Äther. Nach Zusatz von warmem Ligroïn zu der durch Eindampfen etwas konzentrierten Flüssigkeit bis zur beginnenden Trübung scheidet sich beim Abkühlen das dl-Benzoylleucin in farblosen, rhombenähnlichen Platten oder kurzen, zu Drusen vereinigten Prismen ab. Die Ausbeute an diesem reinen Produkt beträgt 70—75% der Theorie.

Darstellung von Benzoyl-d-leucin aus Benzoyl-dl-leucin: 30 *g* Benzoyl-dl-leucin und 37·7 *g* Cinchonin (molekulare Mengen) werden fein zerrieben und in 3 *l* siedendem Wasser gelöst. Beim Erkalten scheidet sich zunächst eine kleine Menge des Salzes als zähe Masse ab, dann aber folgen feine, farblose Nadeln. Ihre Menge beträgt nach zwölfstündigem Stehen etwa 25 *g*. Aus der Mutterlauge gewinnt man noch 5 *g*, so daß die Gesamtausbeute 88% der Theorie beträgt. Zur Reinigung wird das Salz aus 100 Teilen siedendem Wasser umkristallisiert, wobei die erste Kristallisation, welche ungefähr 60% des gelösten Salzes beträgt, ganz rein ist, während aus der Mutterlauge noch etwa 25% weniger reines Material erhalten werden.

---

[1]) Vgl. *Emil Fischer,* Über die Spaltung einiger razemischer Amidosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 2451 (1899). — II. Mitteilung. Ebenda. Jg. **31**. S. 3638 (1900). — III. Mitteilung. Ebenda. Jg. **33**. S. 2370 (1900). — IV. Mitteilung (mit *A. Mouneyrat*). Ebenda. Jg. **33**. S. 2383 (1900). — V. Mitteilung (mit *Rudolf Hagenbach*). Ebenda. Jg. **34**. S. 3764 (1901).

Das Salz bildet farblose, meist zu Büscheln vereinigte Nadeln, welche nicht ganz scharf bei 85° schmelzen. Aus verdünnter Lösung scheidet es sich manchmal bei längerem Stehen in großen, rautenförmigen Blättern oder Prismen ab. In heißem Alkohol ist es sehr leicht löslich und kristallisiert beim Abkühlen in biegsamen Nadeln. Von Äther wird es etwa ebenso leicht, wie von heißem Wasser gelöst.

Zur Gewinnung des Benzoyl-d-leucins werden 20 *g* fein gepulvertes Salz in 500 *cm*³ Wasser suspendiert, mit 50 *cm*³ Normalkalilauge versetzt und auf dem Wasserbade unter kräftigem Schütteln digeriert, bis vom ursprünglichen Salz nichts mehr zu bemerken ist. Man läßt erkalten, filtriert vom Cinchonin ab, fügt zur Mutterlauge 54 *cm*³ Normalsalzsäure und verdampft im Vakuum auf etwa 40 *cm*³. Dabei fällt das Benzoyl-d-leucin größtenteils als harzige Masse aus. Dasselbe wird ausgeäthert, die ätherische Lösung konzentriert und bis zur Trübung mit Ligroïn versetzt. Beim völligen Erkalten scheidet sich in der Regel ein dickes Öl ab, das bei starker Abkühlung in einer Kältemischung und beim häufigen Reiben nach ein bis zwei Tagen kristallisiert. Ist man einmal im Besitz der Kristalle, so kann man weitere Kristallisationen durch Impfen außerordentlich beschleunigen. Die kurzen derben Prismen enthalten ¹/₂ Mol. Kristalläther, welcher beim Erwärmen im Vakuum auf 50° entweicht.

Bei gewöhnlicher Temperatur entweicht der Äther im Vakuum nur unvollständig. Die ätherhaltige Substanz schmilzt unscharf gegen 60°, die ätherfreie Verbindung bei 104—106° (105—107° korrigiert). Letztere läßt sich auch direkt aus der Lösung in Ätherligroïn durch Einimpfen von ätherfreien Kristallen gewinnen. Zur Lösung bedarf die Verbindung ungefähr 120 Teile kochenden Wassers; beim Erkalten fällt sie daraus zunächst als Öl, das jedoch bald zu kurzen, dicken Prismen erstarrt.

Darstellung von d-Leucin aus dem Benzoyl-d-leucin: Erhitzt man die Benzoylverbindung mit der hundertfachen Menge 10%iger Salzsäure am Rückflußkühler, so tritt nach etwa 1¹/₂ Stunden völlige Lösung des geschmolzenen Benzoylkörpers ein, und nach 7 Stunden ist die Hydrolyse beendet. Die Flüssigkeit wird im Vakuum auf den zwanzigsten Teil eingedampft, dann zur völligen Entfernung der Benzoësäure mehrmals ausgeäthert und nun wieder im Vakuum zur Trockene verdampft. Das zurückbleibende salzsaure Leucin wird in der üblichen Weise durch Kochen der wässerigen Lösung mit gelbem Bleioxyd entchlort, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und die Mutterlauge verdampft, bis der größte Teil des d-Leucins auskristallisiert ist.

Darstellung von Benzoyl-l-leucin aus Benzoyl-dl-leucin: Zur Gewinnung desselben dienen die ersten Mutterlaugen vom Cinchoninsalz des optischen Isomeren. Sie werden zunächst mit einem kleinen Überschuß von Normalkalilauge zur Fällung des Cinchonins versetzt, dann das Filtrat mit Normalsalzsäure schwach übersättigt. Läßt man jetzt die Flüssigkeit 12 Stunden stehen, so scheidet sich das noch in Lösung befindliche razemische Benzoylleucin, welches namentlich in kaltem Wasser viel

schwerer löslich ist, als die aktive Form, zum größten Teile ab. Seine Menge beträgt etwa 20% des angewandten Razemkörpers. Die Mutterlauge wird im Vakuum stark eingedampft, bis der größte Teil des Benzoyl-l-leucins abgeschieden ist. Man gießt dann den Rest der Flüssigkeit weg, löst das abgeschiedene Harz in wenig Alkali und fällt wieder in der Kälte mit Säure; nach kurzer Zeit erstarrt der Niederschlag kristallinisch. Zur völligen Reinigung wird das Produkt in das Chinidinsalz verwandelt.

Zu dem Zweck werden 16 *g* Benzoylleucin mit 25 *g* der kristallisierten Base in $4^1/_2$ *l* heißem Wasser gelöst. Beim Erkalten scheiden sich davon 21 *g* des Salzes in farblosen, ziemlich dicken Prismen oder rechteckigen Tafeln ab. Die Mutterlauge gibt, in geeigneter Weise konzentriert, noch eine zweite, nicht unbeträchtliche Kristallisation. Zur völligen Reinigung ist es ratsam, das Salz noch einmal aus heißem Wasser umzukristallisieren. Für die Rückverwandlung in Benzoyl-l-leucin dient das bei dem Cinchoninsalz der isomeren Substanz beschriebene Verfahren.

Die Verbindung schmilzt, ebenso wie der optische Antipode, im ätherhaltigen Zustand gegen 60° und getrocknet bei 105—107° korr.

Darstellung von l-Leucin aus Benzoyl-l-leucin: Sie erfolgt in genau der gleichen Weise, wie diejenige des d-Leucins aus Benzoyl-d-leucin.

An Stelle der Benzoylverbindung kann mit Vorteil die Formylverbindung verwendet werden[1]):

Darstellung von Formyl-dl-leucin. Vgl. S. 496.

Das Formyl-leucin zeigt keinen konstanten Schmelzpunkt; es wird bei 112° weich und schmilzt bei 114—115° (115—116° korr.). Es löst sich sehr leicht in absolutem Alkohol und heißem Wasser, und ziemlich leicht in heißem Essigester; ziemlich schwer in Äther, Benzol und Chloroform; in Petroläther ist es fast unlöslich. Beim langsamen Abkühlen in wässeriger Lösung kristallisiert es in schön ausgebildeten Formen, die unter dem Mikroskop an Oktaëder mit häufig abgeschrägten Ecken erinnern. Es reagiert sauer und löst sich leicht in Alkalien und Ammoniak.

Spaltung des Formyl-dl-leucins mit Brucin: Zu einer Lösung von 50 *g* Formyl-dl-leucin in 4 *l* absolutem Alkohol setzt man 124 *g* wasserfreies Brucin (1 Mol.) und erwärmt unter Umschütteln, bis völlige Lösung eingetreten ist. Beim Abkühlen erfolgt sofort die Kristallisation vom Brucinsalz des Formyl-d-leucins. Man läßt unter zeitweisem Schütteln 12 Stunden im Eisschrank stehen, saugt die Kristallmasse scharf ab und wäscht sie sorgfältig mit etwa 500 *cm*³ kaltem Alkohol. Die Menge der Kristallmasse beträgt ungefähr 93 *g*. Umlösen des Salzes hat keinen Zweck, da dadurch kein reineres aktives Formyl-leucin erhalten wird. Die alkoholische Mutterlauge, die das Brucinsalz des Formyl-l-leucins enthält, wird unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand in 450 *cm*³ Wasser gelöst,

---

[1]) *Emil Fischer* und *Otto Warburg*, Spaltung des Leucins in die optisch-aktiven Komponenten mittelst der Formylverbindung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 38. S. 3997 (1905).

dann die Flüssigkeit auf 0° abgekühlt und mit 175 cm^3 Normalnatronlauge versetzt: dadurch wird das Brucin gefällt. Man läßt noch etwa 10 Minuten in Eis stehen, saugt dann ab und wäscht mit wenig kaltem Wasser. Um den sehr kleinen Rest des Brucins zu entfernen, kann man das Filtrat erst mit Chloroform und dann nochmals mit Äther ausschütteln, bis die wässerige Lösung mit Salpetersäure keine Brucinreaktion mehr gibt.

Um den größeren Teil des Alkalis, das bei längerer Einwirkung eine partielle Hydrolyse des Formylkörpers bewirken kann, zu neutralisieren, fügt man möglichst bald 23 cm^3 5fach Normalsalzsäure zu, verdampft unter geringem Druck auf etwa 100 cm^3 und übersättigt jetzt durch weitere Zugabe von 15 cm^3 derselben Salzsäure. Dadurch wird die Abscheidung des Formyl-l-leucins, die schon während des Einengens begonnen hat, vervollständigt. Man läßt noch eine Viertelstunde in Eiswasser stehen, saugt dann ab und wäscht mit kaltem Wasser.

Das Formyl-d-leucin wird aus dem kristallisierten Brucinsalz ganz in der gleichen Weise gewonnen.

Hydrolyse der Formylverbindung: Die Abspaltung der Formylgruppe läßt sich sowohl mit Säuren, wie mit Alkalien leicht bewerkstelligen. Für die Gewinnung der aktiven Form ist die saure Hydrolyse vorzuziehen, weil die Gefahr der Razemisierung geringer ist. Dementsprechend wird für die Darstellung des l-Leucins die Formylverbindung mit der 10fachen Menge 10%iger Salzsäure 1—1½ Stunden am Rückflußkühler gekocht und dann die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck möglichst stark eingedampft. Den Rückstand löst man in Wasser und verdampft jetzt auf dem Wasserbade, um den Rest der überschüssigen Salzsäure und geringe Mengen von Ameisensäure zum allergrößten Teil zu entfernen. Zum Schluß löst man wieder in Wasser, verdünnt auf ein bestimmtes Volumen und bestimmt in einem aliquoten Teil dieser Lösung titrimetrisch das Chlor. Dann fügt man zu dem Hauptteil der Flüssigkeit die nach dem Chlorgehalt berechnete Menge einer Normallösung von Lithiumhydroxyd, verdampft auf dem Wasserbade auf ein geringes Volumen, bis der größte Teil des Leucins auskristallisiert ist, und fällt den Rest durch absoluten Alkohol, wobei das Lithiumchlorid in Lösung bleibt.

Methoden zur biologischen Spaltung razemischer Aminosäuren durch lebende Organismen.

Von **Felix Ehrlich.**

Die Methoden zur biologischen Spaltung razemischer Aminosäuren beruhen auf der Fähigkeit des tierischen und pflanzlichen Organismus, die Razemverbindungen von α-Aminosäuren der allgemeinen Formel $R.CHNH_2.COOH$ asymmetrisch zu zerlegen in der Weise, daß von den beiden Komponenten des Razemkörpers der eine durch Abbau respektive Assimilation entfernt wird, während der andere fast vollständig oder zum großen Teil unangegriffen zurückbleibt, so daß also aus der ursprünglich inaktiven Substanz eine optisch-aktive entsteht. Im Gegensatz zu den chemischen Verfahren [1], die eine Aufspaltung der razemischen Aminosäure in beide Stereoisomere — sowohl die rechtsdrehende wie die linksdrehende — erlauben (vgl. S. 554), liefert die biologische Methode immer nur eine Modifikation bestimmter Drehungsrichtung, und zwar aus den Razemverbindungen natürlich vorkommender Aminosäuren stets nur den optischen Antipoden der natürlichen Verbindung. So erhält man z. B. aus dem razemischen Alanin das l-Alanin, aus dem razemischen Leucin das d-Leucin. Je nach der Dauer und Intensität der Einwirkung der Organismen werden dabei die optisch aktiven Verbindungen rein mit ihrem vollen Drehungswert oder niedriger drehend noch mit dem Razemkörper gemischt gewonnen.

Die biologische Spaltungsmethode kann dazu dienen, den Nährwert einer Aminosäure für einen Organismus festzustellen. Ist nämlich die ursprünglich inaktive razemische Aminosäure nach seiner Einwirkung optisch aktiv geworden, so bedeutet dies, daß die Aminosäure für den betreffenden Organismus angreifbar ist. Aus der Drehungsrichtung und der Menge der zurückgewonnenen Aminosäure kann geschlossen werden, welche Komponente besser ausgenützt wird und in welchem Maße.

Als Arbeitsmethode für die präparative Darstellung der Antipoden natürlich vorkommender Aminosäuren besitzt unter den biologischen Ver-

---

[1] *Emil Fischer,* Über die Spaltung einiger razemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **32**. S. 2451, 3638 (1899); Bd. **33**. S. 2370, 2383 (1900); Bd. **34**. S. 3764 (1901).

fahren nur die Vergärung der razemischen Aminosäuren mit Hefe größere praktische Bedeutung. Mit ihrer Hilfe kann man die der natürlichen entgegengesetzt drehende Aminosäure in den meisten Fällen schnell und bequem auch in größeren Quantitäten in Ausbeuten von 60—80% der Theorie gewinnen. Da die *Walden*sche Umkehrung[1]) häufig die fast quantitative Verwandlung einer optisch aktiven Aminosäure in ihr Spiegelbildisomeres gestattet, so kann man ausgehend von der razemischen Aminosäure in gewissen Fällen auch indirekt mittelst der Gärmethode zu der natürlichen Verbindung oder ihren Derivaten gelangen, was unter Umständen besonders für die Darstellung von optisch-aktiven Polypeptiden der natürlich vorkommenden Aminosäure, z. B. des d-Alanyl-d-Alanins[2]), von Wert ist (vgl. S. 547). Die Gärmethode ermöglicht ferner die Isolierung von optisch-aktiven Stereoisomeren der Aminosäuren mit mehr als einem asymmetrischen Kohlenstoffatom, die durch sterische Umlagerung entstehen, aber nicht Spiegelbilder der ursprünglichen Aminosäure sind, z. B. die Abtrennung des d-Allo-Isoleucins aus seinem Gemisch mit dem d-Isoleucin, wie es durch Kochen der letzteren Verbindung mit Barytwasser gebildet wird. Schließlich besitzt das Hefegärverfahren auch analytischen Wert, da man mit Hilfe desselben Aminosäuren aus natürlichen Produkten, die durch irgendwelche chemische Eingriffe partiell oder total razemisiert sind, schnell auf ihr ursprüngliches spezifisches Drehungsvermögen untersuchen kann.

Außer auf razemische Aminosäuren ist die biologische Methode auch anwendbar auf razemische Polypeptide, die durch die verschiedensten Organismen in ähnlicher Weise asymmetrisch gespalten werden, indem die der natürlichen entsprechende Modifikation vorwiegend abgebaut wird, die andere aber zum größten Teil erhalten bleibt und eventuell optisch rein zu gewinnen ist.

Abgesehen von den leicht autorazemisierbaren Aminosäuren versagt die biologische Methode allgemein in den Fällen, in denen die Unterschiede der Angriffsgeschwindigkeiten beim Abbau der d- und l-Komponente sehr gering oder gleich Null sind, so daß selbst bei längerer und wiederholter Einwirkung des betreffenden Organismus die Aminosäure oder das Polypeptid in immer kleineren Mengen nur sehr schwach drehend oder inaktiv wieder isoliert werden kann.

Spaltung durch den tierischen Organismus.[3])

Die Darreichung der razemischen Aminosäure geschieht am besten per os. Der innerhalb 24—36 Stunden nach Eingabe der Substanz aus-

[1]) *Emil Fischer*, Zur Kenntnis der *Walden*schen Umkehrung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **40**. S. 489 (1907).

[2]) *Emil Fischer* und *Arnold Schulze*, Synthese von Polypeptiden. XVI. Derivate des d-Alanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **40**. S. 943 (1907).

[3]) *J. Wohlgemuth*, Über das Verhalten stereoisomerer Substanzen im tierischen Organismus. Die inaktiven Monoaminosäuren. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **38**. S. 2064

geschiedene Harn wird gesammelt, nach eventueller Vorklärung mit Bleiacetat oder Bleiessig eingedampft und daraus in üblicher Weise die optisch-aktive Aminosäure isoliert. Aminodikarbonsäuren kann man auch aus dem Harn durch Fällung mit Quecksilberacetat und Zersetzung des Niederschlages mit Schwefelwasserstoff wiedergewinnen. Zur Isolierung sind ferner auch die Kupfersalze der Aminosäuren in vielen Fällen geeignet.

Beispiel: Einem Kaninchen werden in einer Portion 10 *g* d-l-Leucin per os verabreicht. Der innerhalb 24 Stunden aufgefangene Urin wird mit Bleiacetat gefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und die schließlich erhaltene Lösung auf dem Wasserbad bis zur Kristallisation eingedampft. Der über Nacht entstandene Kristallbrei wird mit etwas Alkohol verrührt und scharf abgesaugt. Zurückgewonnen werden auf diese Weise 2·5 *g* d-Leucin, das durch Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol leicht vollständig zu reinigen ist.

Spaltung durch pflanzliche Organismen.

Als solche kommen im wesentlichen nur Mikroorganismen in Betracht, besonders Schimmelpilze und Hefen.

Die Spaltung kann nach zwei prinzipiell verschiedenen Methoden ausgeführt werden.

Die eine Methode besteht darin, daß man Spuren der Reinkultur eines Pilzes in eine sterilisierte Nährlösung einimpft, die außer den nötigen anorganischen und eventuell organischen Bestandteilen die betreffende razemische Aminosäure als einzigen stickstoffhaltigen Nährstoff enthält, und in dieser Lösung den Pilz unter den für ihn günstigsten Bedingungen zu intensivem Wachstum bringt.

Bei der anderen Methode läßt man dagegen den bereits fertig gebildeten Pilz, am besten Hefe in Form von Preßhefe, in großem Überschuß auf die Lösung der razemischen Aminosäure einwirken, die außerdem nichts weiter als eine genügende Menge Zucker enthält. In dem Maße, wie der Zucker durch die Hefe vergoren wird, reichert sich diese mit dem Stickstoff der Aminosäure an, die dabei asymmetrisch abgebaut wird. Bei richtiger Abmessung der Mengenverhältnisse von Aminosäure, Zucker und Hefe läßt sich so leicht eine totale Spaltung der razemischen Aminosäure erzielen. Diese Methode ist wegen ihrer bequemen Handhabung und ihres schnellen und vollständigen Verlaufs der ersteren vorzuziehen.

(1905). — *A. Schittenhelm* und *A. Katzenstein*, Verfütterung von i-Alanin am normalen Hunde. Zeitschr. f. experiment. Patholog. u. Therap. Bd. 2. S. 560 (1906). — *E. Abderhalden* und *F. Samuely*, Der Abbau des Leucins und des Leucyl-leucins im Organismus des Hundes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **47**. S. 346 (1906). — *E. Abderhalden* und *K. Kautzsch*, Der Abbau des dl-Leucyl-glycins und dl-Leucyl-glycyl-glycins im Organismus des Kaninchens. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 557 (1906).

I. Spaltung durch Pilzkultur.[1])

Als Pilzmaterial verwendet man vorteilhaft Schimmelpilze, besonders Penicillium glaucum und Aspergillus niger, sowie Hefepilze, untergärige und obergärige Bierhefe, in Reinkulturen.

Bei Ausführung der Methode sind im übrigen hinsichtlich der Sterilisierung der Gefäße und Lösungen alle bei bakteriologischen Arbeiten üblichen Vorsichtsmaßregeln zu beachten.

Die Spaltung der Aminosäure wird am besten in einem *Pasteur*schen Kolben oder noch einfacher in Jenenser Stehkolben vorgenommen, die nach gründlicher Reinigung mit einem Wattebausch verschlossen und vor dem Einbringen der Lösungen zunächst einige Zeit auf 160° erhitzt werden.

Die betreffende razemische Aminosäure löst man in einer Konzentration von ca. 3 *g* in $^1/_2$ *l* destilliertem Wasser eventuell unter Kochen und fügt zu der abgekühlten Lösung die für den angewandten Pilz günstigste Nährflüssigkeit.

Als Nährlösungen werden empfohlen:

Für Penicillium glaucum. Zu je 3 *g* Aminosäure in 500 cm^3 Wasser gelöst werden 10 cm^3 einer Nährsalzlösung gesetzt, die in einem Liter enthält:

45·3 *g* Chlorkalium, 10·5 *g* Magnesiumsulfat, 68·5 *g* Monocalciumphosphat, 1·05 *g* Monokaliumphosphat.

Den fertigen Lösungen wird noch etwas freie Phosphorsäure zugefügt, so daß eine ziemlich stark saure Reaktion bestehen bleibt.

Für Aspergillus niger. Pro 6 *g* Aminosäure in einem Liter Wasser werden aufgelöst 40 *g* Zucker, 5 *g* Monokaliumphosphat, 2·5 *g* Magnesiumsulfat, 0·5 *g* Kaliumchlorid und 20 Tropfen einer 5%igen Eisenchloridlösung. Die Nährlösung muß während des Versuches möglichst neutral gehalten werden, da in sauren Lösungen das Wachstum des Pilzes stark leidet.[2]) Die Abstumpfung der Acidität gelingt am besten, indem man von vornherein der Flüssigkeit etwas Calciumkarbonat zusetzt.

Für Hefe. 5 *g* Aminosäure werden in einem Liter einer 10%igen Zuckerlösung aufgelöst, die außerdem pro Liter enthält: 0·75 *g* Dikaliumphosphat, 0·1 *g* Magnesiumsulfat, Spuren von Chlornatrium und Eisenvitriol. Die anfängliche Reaktion der Lösung muß schwach sauer sein.

Die in dieser Weise mit Nährsalzen versetzten Aminosäurelösungen werden in die Glaskolben übergefüllt und nach Verschließen derselben mit einem Wattebausch sterilisiert, indem man sie an je 3—5 aufeinander-

[1]) *E. Schulze* und *Boßhard*, Untersuchungen über die Amidosäuren, welche bei der Zersetzung der Eiweißstoffe durch Salzsäure und durch Barytwasser entstehen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **10**. S. 134 (1886). — *E. Schulze* und *A. Likiernik*, Über die Konstitution des Leucins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **17**. S. 513 (1892).

[2]) *F. Czapek* und *E. Kohn*, Beobachtungen über Bildung von Säure und Alkali in künstlichen Nährsubstraten von Schimmelpilzen. Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie. Bd. 8. S. 302 (1906). — *J. Nikitinsky*, Jahrbücher f. wissenschaftl. Botanik. Bd. **40**. S. 1 (1904), zitiert bei *F. Czapek*.

folgenden Tagen je $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang zum Sieden erhitzt. Die abgekühlten Lösungen werden dann wie üblich mittelst eines ausgeglühten Platindrahts mit der Reinkultur des betreffenden Pilzes geimpft und schließlich bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank bei dem Temperaturoptimum des angewandten Mikroorganismus sich selbst überlassen.

Die Entwicklung des Pilzes beginnt bereits nach einigen Tagen. Es zeigen sich dann gewöhnlich weißliche Flecke auf der Oberfläche der Flüssigkeit, die sich nach und nach vollständig mit einer sporentragenden Pilzdecke überzieht. Ein Teil des Pilzmycels entwickelt sich untergetaucht in der Lösung am Boden des Gefäßes. Bei Anwendung von Hefe trübt sich der Kolbeninhalt allmählich unter Aufsteigen von Gasblasen.

Die Versuche können als beendet gelten, wenn die Pilzdecke kein merkliches Wachstum mehr zeigt und eine Gasentwicklung in der Flüssigkeit nicht mehr zu beobachten ist. Die Dauer der Pilzspaltung ist eine sehr verschiedene und von vielen Zufälligkeiten abhängig. Sie kann 4 bis 12 Wochen im ganzen betragen. Doch ist auch häufig nach dieser Zeit die Aminosäure nicht optisch rein, sondern noch mit dem Razemkörper gemischt wieder zu gewinnen und muß dann, wenn dies erforderlich, noch ein zweites Mal nach Zugabe von neuer Nährlösung und wiederholter Sterilisierung mit dem betreffenden Pilz angesetzt werden.

Zur Isolierung der unangegriffenen optisch aktiven Aminosäure wird das Pilzmycel durch Filtration entfernt und die farblose bis gelblich gefärbte Flüssigkeit auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Aus dem Rückstand extrahiert man die Aminosäure durch Kochen mit Alkohol, dem etwas konzentrierte Ammoniakflüssigkeit zugesetzt ist. Oder man fällt aus der ursprünglichen filtrierten Lösung die Schwefelsäure und Phosphorsäure mit Barytwasser, kocht das Filtrat mit frisch gefälltem Kupferoxyd und scheidet durch Eindampfen die Aminosäure in Form ihres Kupfersalzes ab, das in üblicher Weise weiter verarbeitet wird.

Beispiel: Die Lösung von 3 *g* dl-Leucin in 500 cm^3 Wasser wird nach Zusatz von 10 cm^3 der erwähnten Nährsalzflüssigkeit in 2 Glaskolben verteilt, sterilisiert und mit Penicillium glaucum geimpft. Nach 6 Wochen wird die Lösung filtriert, eingedampft und der Rückstand mit wässerigem Ammoniak enthaltendem Alkohol ausgekocht, so daß die Salze ungelöst zurückbleiben. Die aus dem Extrakt beim Verdunsten erhaltene rohe Aminosäure liefert umkristallisiert 0·9 *g* reines d-Leucin.

II. Spaltung durch Hefegärung.[1]

Für diese Methode der Aminosäurenspaltung dient ausschließlich gut ausgewaschene und abgepreßte, möglichst eiweißarme obergärige

[1]) *Felix Ehrlich*, Über eine Methode zur Spaltung razemischer Aminosäuren mittelst Hefe. I. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 8 (1906); II. Biochem. Zeitschr. Bd. **8**. S. 438 (1908). — Derselbe, Über das natürliche Isomere des Leucins. II. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **40**. S. 2538 (1907). — *Felix Ehrlich* und *Adolf Wendel*, Zur Kenntnis der Leucinfraktion des Eiweißes. Biochem. Zeitschr. Bd. 8. S. 399 (1908).

Preßhefe. Eine solche wird von Preßhefefabriken aus Getreidewürzen für die Zwecke der Spiritusbrennereien und Bäckereien im großen reingezüchtet und ist unter dem Namen „Reine Getreidepreßhefe" im Handel leicht erhältlich. Besonders bewährt haben sich bisher die obergärigen Preßhefen, Rasse XII, H und M, die in Blechbüchsen eingestampft von der Berliner Hefenzuchtanstalt des Vereins der Deutschen Spiritusfabrikanten in den Handel gebracht werden.[1] Sie enthalten durchschnittlich 25% Trockensubstanz und 2% Stickstoff, d. h. also im Mittel zirka 8% Stickstoff in der Trockensubstanz. Infolge ihres relativ geringen Eiweißgehalts reichern sich diese Hefen bei Gegenwart einer genügenden Menge Zucker sehr leicht mit dem Stickstoff der Aminosäuren an und besitzen dementsprechend für die Razemverbindungen der verschiedensten Aminosäuren ein großes Spaltungsvermögen. Man kann indes für die Spaltung ebensogut Getreidepreßhefe verwenden, wie sie in jedem Bäckerladen zu kaufen ist, muß aber hierbei darauf achten, daß die Hefe keinen Zusatz von Stärkemehl enthält und vorher nicht zu lange warm gelagert war.

Am besten vergärt man die Aminosäuren mit möglichst frisch bereiteter Hefe. Diese kann man aber lange, sogar bis zu 4 Wochen, in ihrer Frische erhalten, wenn man sie sofort nach der Bereitung in gut verschließbare Blechbüchsen mit einem Pistill fest einpreßt und dauernd in einem kühlen und trockenen, möglichst steril gehaltenen Raume aufbewahrt, doch so, daß sie nicht gefriert. Von derartig gelagerter älterer Hefe entfernt man vor Gebrauch vorsichtig ungefähr 1 *cm* der oberen, nach längerer Zeit häufig mit Schimmelpilzen durchsetzten Schicht und benutzt zur Spaltung nur die darunter befindliche, normal schwach gelblich gefärbte Hefe. Nach Entnahme derselben, am besten mit einem Metallspatel, muß der übrige Teil wieder gut eingestampft werden.

Bei der Ausführung des Spaltungsverfahrens selbst ist jede Sterilisierung der Gefäße und Flüssigkeiten sowie jede Anwendung von Nährsalzen überflüssig.

Die Vergärung wird in großen Stehkolben oder Flaschen vorgenommen, die nur zu zwei Drittel oder höchstens drei Viertel ihres Inhalts mit Lösung gefüllt werden, damit später für die gärende Flüssigkeit ein genügender Steigraum freibleibt und ein Überschäumen vermieden wird. Für sehr große Flüssigkeitsmengen benutzt man vorteilhaft die bekannten, in Flaschenkörbe eingesetzten Säureballons.

Die razemische Aminosäure kann in Mengen von 1—100 *g* und mehr auf einmal gespalten werden. Sie wird zur Gärung am besten in ca. $^1/_2$%iger Lösung angesetzt, der Zucker in 10—15%iger Lösung. Im allgemeinen genügen für 10 *g* Aminosäure 200—300 *g* Zucker und 2—3 *l* gewöhnliches Leitungswasser. Als Zucker verwendet man möglichst ungebläute (ultramarinfreie) Raffinade des Handels. Da die Aminosäuren sich meistens in Zuckerlösungen viel leichter als in reinem Wasser lösen, so verfährt man bei

[1] Zu beziehen vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin N., Seestr. 65.

Herstellung der Gärflüssigkeiten geeigneterweise derartig, daß man in den Gärkolben zunächst den Zucker abwiegt, dann die Aminosäure und das Ganze schließlich mit der erforderlichen Menge Wasser übergießt, wobei man die oben im Gefäß haftenden Substanzteile hinunterspült. Der Kolben wird nunmehr eventuell unter Erwärmen auf dem Wasser- oder Dampfbade so lange geschüttelt, bis vollständig klare Lösung eintritt. Ist die Aminosäure sehr schwer löslich, so daß sie beim Erkalten zum Teil wieder auskristallisiert, so gibt man mehr Wasser und eventuell auch noch Zucker hinzu und erhitzt von neuem. Mitunter befördert die Lösung auch ein Zusatz von einigen Tropfen Essig- oder Milchsäure, mit denen man die Flüssigkeit stets schwach ansäuern muß, im Falle die wässerige Lösung der Aminosäure alkalisch reagiert.

In die abgekühlte Lösung wird darauf die Preßhefe eingetragen. Die Menge der anzuwendenden Hefe richtet sich im wesentlichen nach der Menge und dem Stickstoffgehalt der zu vergärenden Aminosäure. Ist der Eiweißgehalt der Hefe ein normaler, so genügen gewöhnlich zur totalen Spaltung von 10 *g* razemischer Aminosäure 100—200 *g* Preßhefe. Bei höherem Eiweißgehalt der Hefe wird man unter Umständen entsprechend mehr anwenden müssen, da sonst die Spaltung leicht unvollständig verlaufen kann. Dasselbe kann eintreten, wenn der Hefe zur Vergärung zu wenig Zucker geboten wird, dessen Menge mindestens das Doppelte der angewandten Quantität Hefe betragen soll. Ein zu großer Überschuß an Hefe und Zucker schadet insofern, als dadurch auch der Antipode der natürlichen Aminosäure merklich angegriffen und seine Ausbeute eine entsprechend geringere wird.

Das Eintragen der abgewogenen Hefe geschieht entweder direkt mit einem Spatel, oder indem man die Hefe vorher mit einem Teil der bereiteten Flüssigkeit in einer Schale gründlich anrührt und dieses Gemisch in die Hauptlösung einträgt. Im Kolbenhals hängenbleibende Hefeteile werden mit destilliertem Wasser hinuntergespritzt. Durch gutes Schütteln des Gefäßes muß dafür Sorge getragen werden, daß die Hefe namentlich anfangs emulsionsartig in der ganzen Flüssigkeit verteilt ist. Der Gärkolben oder -ballon wird dann durch einen Kautschukstopfen mit einem *Meissl*schen Gärverschluß verschlossen (Fig. 45). Einen einfachen Gärverschluß kann man sich auch selbst leicht herstellen, indem man ein gebogenes Glasrohr in ein Reagenzglas durch einen Korkstopfen einführt, der an einer Stelle seitlich eingekerbt ist, um die Gase entweichen zu lassen (Fig. 46). Es genügt, die Gärverschlüsse mit destilliertem Wasser zu beschicken, da sie im wesentlichen hier nur den Zweck haben, den Gärverlauf besser beobachten zu können.

Die in dieser Weise fertig hergestellten, mit Hefe versehenen Zucker-Aminosäurelösungen werden zur Gärung im Laboratorium bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, d. h. zwischen 15—22° C angesetzt. Höhere Temperaturen wirken eher schädlich, da die Flüssigkeiten dann zu stark schäumen und aus der Hefe infolge ihrer gesteigerten autolytischen Tätigkeit zu viel

Substanzen in Lösung gehen, die auf die Aminosäuren später kristallisationshindernd wirken. Die Gärung setzt meistens schon nach 1/4 Stunde mehr oder minder intensiv ein und ist gewöhnlich in 2—4 Tagen beendet. Es empfiehlt sich dabei, das Gärgefäß hin und wieder zur Verteilung der Hefe und zur besseren Entfernung der gelösten Kohlensäure gut zu schütteln. Die Gärung muß stets so lange durchgeführt werden, bis auch die letzten Reste des Zuckers verschwunden sind. Man erkennt diesen Zeitpunkt äußerlich bereits daran, daß die Hefe nach längerer Ruhe sich fast vollständig zu Boden setzt, und daß auch bei starkem Schwenken des Kolbens nur wenige Gasblasen entweichen. Doch muß stets, bevor der Versuch abgebrochen wird, eine hefefreie, wasserklare Probe der Flüssigkeit, wie sie durch Filtration unter Zusatz von frisch gefälltem Tonerdehydroxyd oder Kieselgur leicht zu erhalten ist, erst mittelst Naphtolreaktion auf Zucker untersucht werden.

Bei negativem Ausfall der Zuckerreaktion wird die vergorene Lösung am besten sofort filtriert. Dies geschieht bei kleinem Volumen unter Zusatz irgendwelcher mechanisch klärender Mittel, wie Tonerdebrei, durch geräumige Faltenfilter, wobei

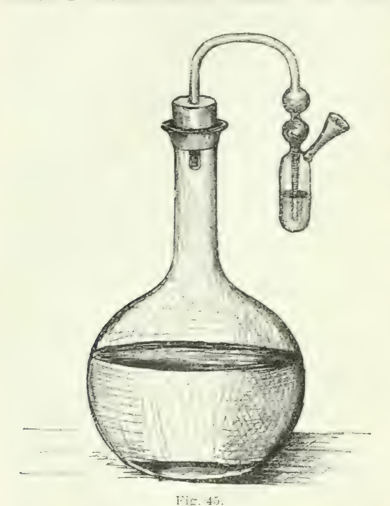


Fig. 45.

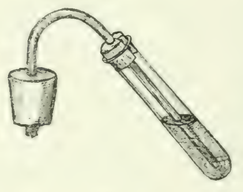


Fig. 46.

die Hefe auf dem Filter mehrmals gründlich mit Wasser ausgewaschen und die abfließende Lösung eventuell noch einmal filtriert werden muß. Für größere Quantitäten der hefehaltigen Flüssigkeit hat sich die Filtriervorrichtung sehr bewährt, die aus Fig. 47 ohne weiteres zu ersehen ist. Als Filter dienen hierbei dünnwandige unglasierte Tonflaschen oder -kolben, wie sie die Kgl. Porzellan-Manufaktur in Berlin in den Handel bringt. Die Tonflasche wird durch eine zweimal knieförmig gebogene Glasröhre mit einer Saugflasche in Verbindung gesetzt, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist. Als Verschlüsse benutzt man Kautschukstopfen. Die vergorene Flüssigkeit wird mitsamt der Hefe in ein Becherglas gegossen, in das man die Tonzelle, wie die Figur zeigt, einsenkt. Der Wasserhahn zur Pumpe wird dann leicht geöffnet, wodurch die Flüssigkeit

erst in den Tonkolben und von da sofort wasserklar in die Saugflasche übergesaugt wird, aus der man sie von Zeit zu Zeit entfernt. Nach völliger Trennung der Lösung von der Hefe wird diese, wenn sie fast trocken gesaugt ist, noch ein- oder zweimal mit Wasser nachgewaschen. Die Tonkolben, die sich erst nach längerem Gebrauch mit Hefe allmählich verstopfen, können schnell wieder gebrauchsfähig gemacht werden, indem man sie einige Stunden in angesäuerter Bichromatlösung erhitzt und dann gut durchwässert.

Die hefefreien Filtrate der vergorenen Flüssigkeit werden in Porzellanschalen zunächst über freier Flamme und dann auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingedampft, darauf noch einige Zeit zur Klärung und Entfärbung mit Tierkohle warm digeriert, filtriert und nunmehr bis zur Bildung einer Kristallhaut zum dünnen Sirup eingeengt. Zu starkes

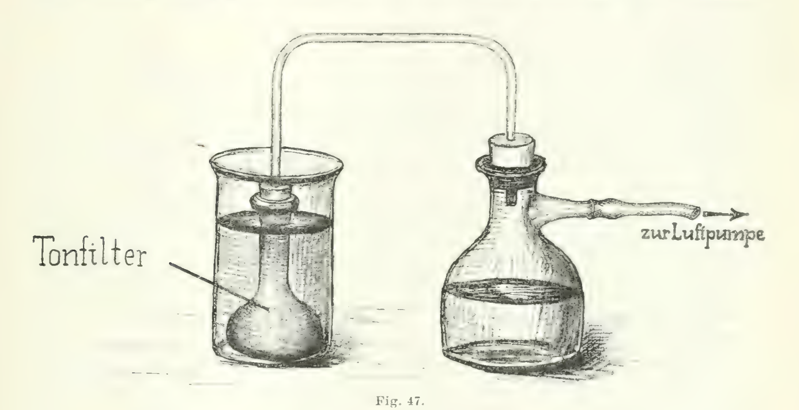


Fig. 47.

Eindampfen empfiehlt sich dabei nicht, da die dicken Sirupe in diesem Falle schwer von den Aminosäuren zu trennen sind. Die Lösungen empfindlicher Aminosäuren konzentriert man am besten im Vakuum bei niedriger Temperatur. Im Falle Gefahr vorliegt, daß die aktive Aminosäure sich durch Einwirkung der bei der Gärung entstandenen Säuren in der Hitze wieder razemisieren kann, ist es vorteilhaft, ihre Lösung beim Eindampfen durch wiederholten Zusatz von wässerigem Ammoniak dauernd schwach alkalisch zu halten.

Aus den durch Verdampfen gewonnenen Sirupen kristallisieren die meisten aktiven Aminosäuren sehr leicht, gewöhnlich schon sofort nach dem Erkalten aus. Die Abscheidung ist meist bereits nach 24 Stunden eine annähernd vollständige. Man saugt die Kristalle auf der Nutsche über Fließpapier oder manchmal besser über feinem Haarfilz scharf ab und befreit sie durch Pressen auf Ton von den letzten Resten der Mutterlauge

möglichst vollständig. Das Filtrat ergibt gewöhnlich eingedampft noch eine kleine Menge Aminosäure. Aus den Mutterlaugen leichter löslicher Aminosäuren lassen sich nach mehrwöchentlicher Aufbewahrung bisweilen noch geringe Reste Substanz abscheiden. Das auf Ton getrocknete Rohprodukt wird wie üblich aus Wasser oder Alkohol umkristallisiert. Um hierbei auch geringe, aus der Gärung herstammende Verunreinigungen sicher zu entfernen, empfiehlt es sich in der Weise zu arbeiten, daß man die rohe Aminosäure zunächst in der genügenden Menge 95%igen Alkohols suspendiert, am Rückflußkühler aufkocht und nunmehr unter stetem Kochen allmählich soviel Wasser portionsweise zugibt, daß die Kristalle der Aminosäure gerade gelöst sind, während die Verunreinigungen als Trübungen und Flocken in der Flüssigkeit herumschwimmen, einen Punkt, den man bei einiger Übung leicht erkennen kann. Die Lösung wird dann noch mit Tierkohle versetzt, kurze Zeit aufgekocht, filtriert und das Filtrat mit konzentriertem Alkohol bis zur beginnenden Kristallisation übersättigt.

Ist die Aminosäure ausnahmsweise durch Eindampfen der vergorenen Flüssigkeit nicht kristallisiert zu erhalten, so muß ihre Isolierung durch irgend eine andere der sonst üblichen Methoden vorgenommen werden. Am meisten empfiehlt sich in diesem Falle die Abscheidung über das Kupfersalz, auf dessen eventuelle Löslichkeit in Methyl- oder Äthylalkohol besonders zu achten ist.

Ergibt die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens der isolierten Aminosäuren, daß diese nicht, wie gewünscht, optisch rein, sondern noch mit dem Razemkörper gemengt erhalten worden ist, so muß die Aminosäure noch einmal vergoren werden, wobei man sie dann zweckmäßig nur etwa mit der Hälfte der vorher angewandten Mengen Hefe und Zucker behandelt.

Die Ausbeuten an reiner optisch aktiver Aminosäure bei dem beschriebenen Gärverfahren betragen gewöhnlich $^2/_3$ bis $^3/_4$ von der Menge der theoretischen, da bei Anwendung von soviel Hefe, wie nötig ist, um nur genau die eine Komponente der Razemverbindung abzubauen, stets auch eine geringe Quantität der anderen Komponente mitangegriffen wird.

Die Hefegärmethode eignet sich besonders zur Darstellung von l-Alanin, l-Valin, d-Leucin, d-Allo-Isoleucin, l-Isoleucin, l-Glutaminsäure, d-Histidin, d-Phenylalanin und d-Serin.

Beispiele.

l-Alanin.

100 *g* dl-Alanin werden zusammen mit 3 *kg* Zucker in einem großen Glasballon in 25 *l* Wasser gelöst und mit $1^1/_2$ *kg* frischer Preßhefe vergoren. Nach 3 Tagen ist die Gärung beendet und die Lösung zuckerfrei. Die Hefe wird abfiltriert, das klare Filtrat auf ein kleines Volumen eingeengt, durch Kochen mit Kohle geklärt und zum dünnen Sirup verdampft, der über Nacht kristallisiert. Die direkt und nach weiterer Konzentrierung der Mutterlauge erhaltenen abgesaugten Kristalle werden auf Ton gepreßt,

nach dem Trocknen in wenig heißem Wasser gelöst und aus der Lösung mit Alkohol gefällt. Ausbeute an reinem l-Alanin 25—30 *g*.

d-Allo-Isoleucin.

5 *g* eines Gemisches von d-Isoleucin und d-Allo-Isoleucin, das durch 20stündiges Erhitzen von d-Isoleucin mit Barytwasser auf 180° hergestellt ist, werden in einem 3 *l*-Stehkolben zusammen mit 200 *g* Zucker in 2 *l* Wasser gelöst und mit 100 *g* frischer Preßhefe vergoren. Nach 2tägiger Gärung ist kein Zucker mehr in der Lösung nachzuweisen. Die von der Hefe abfiltrierte Flüssigkeit ergibt nach der Behandlung mit Tierkohle auf dem Wasserbade verdampft einen schnell kristallisierenden Sirup. Das nach zweitägigem Aufbewahren daraus durch Absaugen und Abpressen auf Ton erhaltene Kristallmehl liefert nach zweimaligem Umkristallisieren aus heißem Alkohol unter tropfenweisem Zusatz von Wasser 1·8 *g* reines d-Allo-Isoleucin.

d-Serin.

10 *g* dl-Serin werden in einem 4 *l*-Stehkolben zusammen mit 300 *g* Zucker in 3 *l* Wasser gelöst und die Lösung mit 200 *g* frischer Preßhefe vergoren. Die Gärung ist in 1½ Tagen beendet. Die abfiltrierte zucker- und hefefreie Lösung wird unter vermindertem Druck bis auf ein kleines Volumen eingeengt und nach Behandlung mit Tierkohle auf dem Wasserbad vorsichtig zum Sirup verdampft. Nach zwölfstündigem Stehen unter starker Kühlung mit Eis und häufigem Reiben trübt sich der Sirup allmählich und scheidet schließlich einen feinen Kristallbrei ab. Dieser gibt scharf abgesaugt und auf Ton gepreßt 2·8 *g* eines weißen Pulvers. Das Rohprodukt wird in wenig Wasser gelöst und unter schwachem Erwärmen mit Tierkohle gereinigt. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen verdampft und die konzentrierte Lösung mit absolutem Alkohol bis gerade zur beginnenden Abscheidung der Aminosäure versetzt. Nach 12stündigem Stehen kristallisiert das Serin in feinen Nadeln aus, die abgesaugt, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet werden. Ausbeute 2·5 *g* reines d-Serin.

Nukleinsäuren und deren Abbauprodukte.

a) Isolierung der Nukleinsäuren und deren Abbau, Darstellung der Spaltungsprodukte.

Von **H. Steudel**, Berlin.

I. Isolierung und Abbau der echten Nukleinsäure aus tierischen Organen.

Echte Nukleinsäuren, d. h. Nukleinsäuren, die nach dem Typus der Nukleinsäure aus der Thymusdrüse aufgebaut sind, kommen in den Zellkernen fast aller Organe vor. Ihre Menge ist dort aber für gewöhnlich nur sehr gering, so daß die Isolierung einer reinen und unzersetzten Nukleinsäure z. B. aus Leber umständlich ist. Die meisten Organe eignen sich deshalb nicht zur präparativen Darstellung der Nukleinsäure. Ein gutes Ausgangsmaterial für die Gewinnung der echten Nukleinsäure ist nur das reife Fischsperma (*Miescher, Noll, Steudel*[1]), die Thymusdrüse (*Kossel* und *Neumann*[2]) und von pflanzlichen Zellen die Hefe (*Hoppe-Seyler, Altmann*[3]). Am einfachsten liegen die Verhältnisse beim reifen Fischsperma: die Spermatozoenköpfe enthalten außer Nukleinsäure und Protamin nichts Wesentliches, aber auch aus den Zellen der Thymusdrüse läßt sich mit Leichtigkeit die gleiche

[1]) *Fr. Miescher,* Die Spermatozoen einiger Wirbeltiere. Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel. 1874. Auch Gesammelte Abhandlungen. Bd. **2**. S. 55. Leipzig, F. W. Vogel, 1897. — Derselbe, Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. Gesammelte Abhandlungen. Bd. **2**. S. 359. — *Alfred Noll,* Über die Bildung von Lävulinsäure aus Nukleinsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **25**. S. 430 (1898). — *H. Steudel,* Über die Oxydation der Nukleinsäure. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **48**. S. 426 (1906). — Derselbe, Die Zusammensetzung der Nukleinsäuren aus Thymus und aus Heringsmilch. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **49**. S. 406 (1906).

[2]) *A. Kossel* und *A. Neumann,* Über das Thymin, ein Spaltungsprodukt der Nukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **26**. S. 2753 (1893). — Dieselben, Darstellung und Spaltungsprodukte der Nukleinsäure (Adenylsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **27**. S. 2215 (1894).

[3]) *F. Hoppe-Seyler,* Über die chemische Zusammensetzung des Eiters. Med.-chem. Untersuchungen. Berlin, A. Hirschwald, 1866—1871. S. 500. — Derselbe, Über Lecithin und Nuklein in der Bierhefe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **2**. S. 427 (1878/79). — *R. Altmann,* Über Nukleinsäuren. Arch. f. (Anat. und) Physiologie. S. 525 (1889).

Nukleinsäure wie aus den Spermatozoen der Fische darstellen, trotzdem hier die physiologisch-chemischen Verhältnisse durch die Gegenwart von Nukleoproteiden, von Nukleohiston usw. theoretisch komplizierter liegen.

Zur Darstellung von Nukleinsäure extrahierte *Miescher*[1]) mit Alkohol entfettetes Sperma vom Lachs (60—70 *g*) bei 0° mehrere (4—5) Male mit Salzsäure (jedesmal 700 *cm*³ 0·5%) zur Entfernung des Protamins, löste den Rückstand in Natronlauge, filtrierte und fällte das Filtrat mit dem doppelten Volumen salzsauren, starken Alkohols. Weil man dauernd bei 0° arbeiten muß, alle Reagentien auf 0° abkühlen und die Arbeit möglichst an einem Tage beenden muß, dabei aber doch nicht sicher ist, daß die Salzsäure die Nukleinsäure zersetzt, so ist die Methode heute ganz verlassen; sie hat nur noch historisches Interesse und zeigt, mit wie großen Schwierigkeiten im Anfang die Gewinnung auch nur kleiner Mengen Nukleinsäure verknüpft war.

Es bedeutete einen großen Fortschritt, als *Kossel* und *Neumann*[2]) zeigten, daß die Nukleinsäure, die gegen freie Mineralsäuren selbst bei Eiseskälte äußerst empfindlich ist, als Alkalisalz respektive als Erdalkalisalz in wässeriger Lösung zum Sieden erhitzt werden kann, ohne sich zu verändern. *Neumann*[3]) hat dann weiter konstatiert, daß man selbst in alkalischer Lösung die Nukleinsäure erwärmen kann, ohne befürchten zu müssen, daß sie sich zersetzt, und auf dieser Beobachtung beruht die bei weitem beste Methode zur Isolierung der Nukleinsäure, nach der man sich beliebige Mengen Substanz bereiten kann, die an Reinheit und Einheitlichkeit jeden Vergleich mit Nukleinsäurepräparaten anderer Darstellung[4]) aushalten können, ja andere Präparate wesentlich übertreffen.

Darstellung der Nukleinsäure nach Neumann.

1 *kg* frische, rein präparierte Thymusdrüsen werden in schwach essigsaurem Wasser rasch aufgekocht. Die Operation hat nur den Zweck, die nun folgende Zerkleinerung der Drüsen zu erleichtern. Sobald die Drüsen durch und durch hart geworden sind, hört man mit dem Sieden auf und gibt nun das Material durch eine gute Fleischhackmaschine. Dann wird der feingehackte Brei mit einer 1·7%igen Natronlauge im siedenden Wasserbade erwärmt; dazu nimmt man auf 1 *kg* Reinthymus 2 *l* Wasser und 100 *cm*³ 33%iger Natronlauge, dem man zweckmäßig noch 200 *g* Natriumacetat hinzufügt. Das Erwärmen nimmt man am besten in einem gut glasierten Emailtopf

---

[1]) *Fr. Miescher*, Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. Gesammelte Abhandlungen. Bd. 2. S. 371.

[2]) *A. Kossel* und *A. Neumann*, Darstellung und Spaltungsprodukte der Nukleinsäure (Adenylsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 27. S. 2215 (1894).

[3]) *A. Neumann*, Zur Kenntnis der Nukleinsubstanzen. Arch. f. (Anat. und) Physiologie. S. 374 (1898). — Derselbe, Verfahren zur Darstellung der Nukleinsäuren a und b und der Nukleothyminsäure. Ebenda. Supplementband. S. 552 (1899).

[4]) *H. Steudel*, Zur Kenntnis der Thymusnukleinsäuren. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46. S. 335 (1905).

vor, den man in einen größeren Topf mit siedendem Wasser hineinhängt. Ein gut passender Deckel erfüllt vollkommen den Dienst eines Rückflußkühlers. Nach etwa halbstündigem Erhitzen hat sich alles bis auf geringe Reste von Bindegewebe mit brauner Farbe gelöst, und will man die gelatinierende Säure a haben, so unterbricht man jetzt das Erhitzen; will man die nicht gelatinierende Form b haben, so erwärmt man noch ca. 1—1½ Stunden weiter. Die fernere Verarbeitung ist in beiden Fällen dieselbe. Man neutralisiert die Natronlauge (auf je 100 cm^3 33%iger NaOH 150 cm^3 50%iger Essigsäure), läßt den entstehenden Niederschlag von Eiweiß in der Wärme sich absetzen, gießt zuerst die überstehende klare, hellgelbe Flüssigkeit und dann den Bodensatz auf ein Faltenfilter, das in einem Heißwassertrichter liegt. Nachdem man dann die Flüssigkeit auf dem Wasserbade eingedampft hat (2 l Ausgangsvolumen auf etwa ½ l), läßt man sie auf etwa 40° erkalten und gießt sie unter Umrühren in das gleiche Volumen 96%igen Alkohols. Dabei fällt das nukleinsaure Natron als zähe, fadenziehende Masse aus. Nach dem vollständigen Erkalten und Klarwerden gießt man die Flüssigkeit ab, filtriert den Niederschlag durch Leinwand und löst ihn in Wasser (in unserem Falle 500 cm^3). Nun erhitzt man auf dem Wasserbade, bis sich aus der trüben Flüssigkeit ein leicht filtrierbarer Niederschlag abgeschieden hat, und die Lösung klar geworden ist. Man filtriert und fällt mit Alkohol. Das reine Natronsalz gibt mit Alkohol keine Fällung; dieselbe entsteht jedoch, wenn man eine konzentrierte Lösung von Natriumacetat in geringer Menge hinzufügt. Nachdem man eventuell durch nochmaliges Umlösen reines Natronsalz gewonnen hat, kann man zwecks Konservierung dieses mit absolutem Alkohol und Äther trocknen. Man erhält dann ein schneeweißes, staubendes Pulver, das sich beliebige Zeit hält. Zur Gewinnung der freien Säure löst man das Natronsalz mit Wasser und fällt durch verdünnte Salzsäure; die Substanz wird dann mit absolutem Alkohol getrocknet.

Gießt man die Lösung des gereinigten Natronsalzes in die dreifache Menge Alkohol, den man vorher mit konzentrierter Salzsäure (2 cm^3 auf 100 cm^3 Alkohol) versetzt hat, so erhält man eine weiße Fällung der freien Säure, die sich langsam zu Boden setzt. Die klare Flüssigkeit wird alsdann abgegossen und der Niederschlag ebenfalls einige Zeit unter starkem Alkohol stehen gelassen.

In beiden Fällen wird nach dem Filtrieren so lange mit absolutem Alkohol nachgewaschen, bis die saure Reaktion verschwunden respektive das Filtrat chlorfrei ist.

Will man aus dem Natronsalz das Kupfersalz resp. ein anderes schwerlösliches Metallsalz gewinnen, so ist es zweckmäßig, die siedend heiße Lösung des nukleinsauren Salzes in dünnem Strahl in die ebenfalls siedend heiße Metallsalzlösung hineinzugießen *(Steudel)*. Nur so erreicht man eine vollständige Umsetzung, weil unter anderen Umständen das schwerlösliche nukleinsaure Kupfer resp. Blei, Zink usw. jeden neu in die Reaktionsflüssigkeit fallenden Tropfen der Metallsalzlösung resp. der Lösung von nukleinsaurem Natron mit einer dicken undurchdringlichen Hülle über-

zieht, die eine weitere Einwirkung verhindert und die Präparate verunreinigt.

Sowohl bei der Darstellung des Natronsalzes sowie des Kupfersalzes ist darauf zu achten, daß zum Schluß das Wasser sorgfältig aus der feinverteilten Substanz durch Alkohol entfernt wird: das geschieht am besten durch wiederholtes Verreiben unter Alkohol. Man erhält sonst leicht glasige oder harzige, zum Schluß steinharte Massen, die nicht weiter verarbeitet werden können oder doch noch einmal gelöst und wieder umgefällt werden müssen. Das Kupfersalz kann man auch an der Luft trocknen lassen, wenn man nur auf sorgfältige Zerbröckelung der größeren Stücke dauernd achtet.

Ausbeute an reiner Nukleinsäure nach diesem Verfahren: Aus je 1 *kg* Reinthymus 30 bis 35 *g*.

Von *Neumann* wurden nach dieser Methode Nukleinsäuren erhalten aus Thymus, Milz, Pankreas und Stierhoden; nach *Steudel* eignet sie sich auch zur Darstellung der Nukleinsäure aus Fischsperma.

Schmiedeberg hat früher [1]) Wert darauf gelegt, daß die Nukleinsäure nach dem sogenannten Kupferkaliverfahren bereitet werde; das Verfahren ist umständlicher wie das von *Neumann* und gestattet nicht, größere Mengen von Ausgangsmaterial auf einmal in Angriff zu nehmen. Außerdem sind die Ausbeuten an reiner Nukleinsäure zum Schluß sehr gering, dazu kommt ferner, daß die Verwandlung des erhaltenen Kupfersalzes in leicht in Wasser lösliche Verbindungen, z. B. Na-Salz, Schwierigkeiten macht, so daß sich *Schmiedeberg* in seiner letzten Arbeit [2]) auch an das *Neumann*sche Verfahren anlehnt. Freilich vermeidet er noch ein Erhitzen des Ausgangsmaterials in alkalischer Lösung in der Furcht, dadurch die Nukleinsäure zu zerstören und melaninartige Produkte zu bekommen. Diese Annahme ist unbegründet; wie die Analysen [3]) von Präparaten zeigen, die nach der *Neumann*schen Methode gewonnen waren, unterscheiden sich diese in nichts von den Substanzen, die nach dem *Schmiedeberg*schen Kupferkaliverfahren bereitet waren. [4]) Der Nachteil aber, in neutraler Lösung zu arbeiten, besteht darin, daß ein Teil der Nukleinsäure nicht aus seiner Verbindung mit Eiweiß gelöst wird und nun als unlöslicher Körper nicht weiter verarbeitet

[1]) *O. Schmiedeberg*, Über die Nukleinsäure aus der Lachsmilch. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. Bd. **43**. S. 57 (1899).

[2]) *O. Schmiedeberg*, Beiträge zur Kenntnis der tierischen Nukleinsäure. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. Bd. **57**. S. 309 (1907).

[3]) *H. Steudel*, Zur Kenntnis der Thymusnukleinsäuren. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 335 (1905).

[4]) Früher hat *Schmiedeberg* nichts gegen das Erwärmen in nicht zu stark alkalischer Lösung einzuwenden gehabt. Arch. f. experm. Path. u. Pharm. Bd. **43**. S. 58: „Es ergab sich, daß die Nukleinsäure in neutraler und nicht zu stark alkalischer Lösung sehr beständig ist und selbst in der Siedehitze keine oder wenigstens keine leichte und rasche Zersetzung erleidet.“ Ebenso hat er *Alsberg* (Beiträge zur Kenntnis der Nukleinsäure. Arch. f. Path. u. Pharm. Bd. **51**. S. 239 [1904]) mit Baryumhydroxydlösung bei 60—80° arbeiten lassen.

wird (die sogenannte „Proteinnukleinsäure“ *Schmiedebergs*) oder doch die weitere Verarbeitung umständlich macht.

Der Vollständigkeit halber sei hier eine Vorschrift von *Schmiedeberg* (Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **57**. S. 321 ff.) wiedergegeben:

Darstellung der Nukleinsäure nach Schmiedeberg.

„Möglichst von Blut und Bindegewebe befreite und feingehackte Thymusdrüsen werden mit dem mehrfachen Volumen Wasser angerührt und in einem Glasballon stark geschüttelt, bis die Drüsensubstanz eine ziemlich gleichmäßige schleimige Beschaffenheit angenommen hat. Sodann wird die Masse mit Essigsäure neutralisiert, doch so, daß sie auch beim Erhitzen etwas sauer reagiert. Man erhitzt zum Sieden, bis das Eiweiß koaguliert und die Flüssigkeit klar geworden ist, die man dann abfiltriert. Die abgegekochte, mit heißem Wasser ausgewaschene und von der Flüssigkeit abgepreßte Drüsenmasse wird mit einer mäßigen Menge halbgesättigter Kochsalzlösung zum Sieden erhitzt und letzteres solange unterhalten, bis die anfänglich gallertartige Masse sich unter Abscheidung von Gerinnseln verflüssigt hat. Hierauf wird in einem Heißwassertrichter filtriert und das Filtrat, welches gelatiniert, noch heiß mit dem 3—4fachen Volum Alkohol versetzt, wodurch das nukleinsaure Natrium gefällt wird, während Eiweißsubstanzen usw. in Lösung bleiben. Durch Umfällen aus siedender Kochsalzlösung mit Alkohol kann das nukleinsaure Natron völlig frei von Eiweiß erhalten werden. Es besteht aber jetzt, zum Teil wenigstens, noch aus der gelatinierenden Nukleinsäure a. Um sie in die nicht gelatinierende b überzuführen, wird sie mit einer mäßigen Menge Kochsalzlösung von 10—15% so lange im Sieden erhalten, bis sich eine geringe Menge einer flockigen Substanz abgeschieden hat und eine herausgenommene Probe beim Erkalten nicht mehr gelatiniert. Dennoch enthält die Lösung noch einen Rest der gelatinierenden Modifikation, den durch längeres Sieden umzuwandeln nicht zweckmäßig ist, weil dabei die Nukleinsäure leicht eine gelbliche Färbung annimmt.

Das Filtrieren kann warm oder kalt vorgenommen werden. Aus dem wasserklaren Filtrat wird das nukleinsaure Natrium durch Alkohol ausgefällt und durch Lösen in Wasser und Umfällen vom Kochsalz befreit. Doch ist das nicht leicht zu erreichen. Deshalb ist es zweckmäßig, das Kochsalz durch Dialyse zu entfernen und dann mit Alkohol zu fällen. Eine in der Wärme dargestellte, konzentrierte Lösung dieses Präparates gelatiniert aber beim Erkalten, weil es noch einen Rest der a-Nukleinsäure enthält. Dieser nicht aufgeschlossene Anteil läßt sich durch fraktionierte Fällung mit Alkohol leicht entfernen, indem er nach Zusatz von ein wenig Alkohol zu der wässerigen Lösung zuerst gefällt wird. Der in Lösung bleibende, aufgeschlossene, nicht gelatinierende Anteil wird dann nach dem Absetzen des ersteren aus der abgegossenen Flüssigkeit durch einen weiteren Zusatz von Alkohol ausgefällt und erst durch Dekantieren und schließlich auf dem Filter mit Alkohol ausgewaschen.“

Legt man wirklich Wert auf die vollkommene Trennung der gelatinierenden und der nicht gelatinierenden Form der Nukleinsäure, so ist es bequemer, statt des *Schmiedeberg*schen Verfahrens die von *Kostytschew*[1]) angegebene Methode zu benutzen, die auf den verschiedenen Eigenschaften der Barytsalze der beiden Nukleinsäuren beruht. Für praktische Zwecke ist diese absolute Trennung übrigens nicht notwendig, durch kurzes Sieden (½ Stunde) nach *Neumann* erhält man fast nur a-Nukleinsäure, während längeres Sieden (1—1½ Stunden) b-Nukleinsäure liefert.

---

[1]) *S. Kostytschew*, Über Thymusnukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 545 (1903).

Eigenschaften der Nukleinsäure.

Die auf die eine oder andere Weise gewonnenen Nukleinsäuren sind weiße, pulverförmige, amorphe Substanzen, in kaltem Wasser schwer löslich, in Alkohol und Äther unlöslich. Sie existieren in zwei verschiedenen Modifikationen, a- und b-Säure, respektive α- und β-Säure, von denen die a-Form schwerer in Wasser löslich ist wie b. In heißem Wasser lösen sie sich unter Zersetzung auf. Ihre Alkalisalze sind in Wasser leicht löslich, eine mindestens 5%ige Lösung des a-nukleinsauren Natrons erstarrt in der Kälte zu einer klaren festen durchsichtigen Gelatine. Die Säuren sind gleichfalls in Ammoniak, Alkalikarbonaten und -acetaten leicht löslich und werden durch Essigsäure nicht aus ihren Lösungen gefällt, dagegen durch Mineralsäuren. Mit Schwermetallen geben sie in Wasser unlösliche Salze, desgleichen mit Erdalkalien schwer lösliche basische Salze. Als Zeichen, daß sie eiweißfrei sind, dürfen sie keine Biuretreaktion geben, ein anderes Zeichen ihrer Reinheit ist, daß eine Lösung von reinem nukleinsaurem Natron mit Alkohol allein keinen Niederschlag gibt, sondern erst auf Zusatz einiger Tropfen konzentrierter wässeriger Natriumacetatlösung. Mit Gerbsäure, Pikrinsäure und Phosphorwolframsäure geben sie keine Fällung, dagegen tritt nach *Araki* mit Gerbsäure ein Niederschlag bei Gegenwart von Natriumacetat ein.[1])

Die nukleinsauren Salze, z. B. das Cu-Salz, lassen sich bei 90—95° bis zur Gewichtskonstanz ohne Zersetzung trocknen; bei höherer Temperatur tritt weitere Gewichtsabnahme ein, dann färben sich die Präparate aber braun, ein Zeichen beginnender Zersetzung.

Den Ergebnissen der quantitativen analytischen Untersuchung der Spaltungsprodukte der Nukleinsäure entspricht am besten die Formel $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$, MG. = 1387·6, l. M. = 14239[2]), sie ist eine vierbasische substituierte Phosphorsäure, in der 4 Wasserstoffatome durch Metall ersetzbar sind. Das neutrale Natriumsalz hat also die Zusammensetzung $C_{43}H_{53}Na_4N_{15}O_{30}P_4$, das Kupfersalz $C_{43}H_{53}Cu_2N_{15}O_{30}P_4$.

Die quantitative Untersuchung der Spaltungsprodukte hat auch den endgültigen Beweis geliefert, daß die Nukleinsäure aus Thymus und aus Fischsperma identisch sind. Die Ergebnisse der Elementaranalyse allein würden bei so kompliziert zusammengesetzten Substanzen zu einem solchen Schluß nicht berechtigt haben.

Die Elementarzusammensetzung der freien Säure ist berechnet:

C 37·18%, H 4·14%, N 15·14%, P 8·94%.

Für diese Berechnung stimmen auch die von *Schmiedeberg* ausgeführten zahlreichen Analysen gut, deren Mittel beträgt: C 36·65%,

[1]) Über enzymatische Zersetzung der Nukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38. S. 93. Anmerkung.

[2]) Die Molekulargewichte, Prozentzahlen und Logarithmen sind berechnet worden nach: *F. W. Küster*, Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Physiker. 7. Aufl. Veit & Co., Leipzig 1907.

H 4·67%, N 15·17%, P 9·37%[1]), so daß kein Grund vorliegt, eine andere Formel zu wählen.

Die echte Nukleinsäure ist optisch-aktiv, sie dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, die Drehung ist abhängig von der Konzentration und der Azidität, respektive Alkaleszenz der Lösung.[2])

In essigsaurer Lösung gibt die Nukleinsäure mit Eiweiß einen Niederschlag (sogenanntes künstliches Nuklein), der in Salzsäure schwer löslich ist.

Sie reduziert nicht *Fehling*sche Lösung, auch nicht nach dem Kochen mit Mineralsäuren, wohl aber erhält man eine der Pentosenreaktion ähnliche Färbung, wenn man Nukleinsäure mit Salzsäure (spez. Gew. 1·19) zum Sieden erhitzt, Phloroglucin hinzufügt, durchschüttelt und sofort abkühlt. Die Flüssigkeit färbt sich kirschrot, doch läßt sich im Gegensatz zur Pentosenreaktion der Farbstoff nicht mit Amylalkohol der Flüssigkeit entziehen.[3])

Die echte Nukleinsäure ist eine Tetrametaphosphorsäure, die, ähnlich der Glyzerinphosphorsäure, an jedem Phosphoratom eine Hexosengruppe enthält, an die dann je ein Molekül Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin gebunden ist.

Abbau der Nukleinsäure.

Der Abbau der Nukleinsäure kann nach verschiedenen Grundsätzen erfolgen. Entweder sucht man durch vorsichtige Einwirkung von Spaltungsmitteln einzelne Teile von dem großen Molekül loszulösen, um dann Substanzen zu erhalten, die der ursprünglichen Nukleinsäure noch relativ nahe stehen, oder man spaltet sofort das ganze Molekül bis in seine einfachen Bruchstücke auf.

Dies letztere geschieht am besten durch siedende Mineralsäuren, Jodwasserstoffsäure[4]), Salzsäure[5]) oder Schwefelsäure[5]), als deren zweckmäßigste und am mildesten wirkende sich die Schwefelsäure[5]) erwiesen hat. Früher hatten *Kossel* und *Neumann*, lediglich um einfachere Bedingungen in der resultierenden Zersetzungsflüssigkeit zu haben, die Nukleinsäure mit starker (20 Volumprozent) Schwefelsäure unter Druck bei 150° erhitzt. Dabei werden die Alloxurbasen ganz oder doch fast ganz zerstört[6]) und

[1]) *O. Schmiedeberg*, Beiträge zur Kenntnis der tierischen Nukleinsäure. Archiv f. exper. Pathol. und Pharm. Bd. **57**. S. 328 (1907).

[2]) *W. Jones*, On the Identity of the nucleic Acids of the Thymus, Spleen and Pancreas. The Journal of Biological Chemistry. Vol. **5**. pag. 11 (1908).

[3]) *H. Steudel*, Über die Kohlenhydratgruppe in der Nukleinsäure. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **56**. S. 215 (1908).

[4]) *H. Steudel*, Zur Kenntnis der Thymusnukleinsäuren. I. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 165 (1904).

[5]) *H. Steudel*, Zur Kenntnis der Thymusnukleinsäuren. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **43**. S. 402 (1904).

[6]) *H. Steudel*, Zur Kenntnis der Thymusnukleinsäuren. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 332 (1905).

Spaltungsprodukte der Nukleinsäure.

Name des Spaltungsprodukts	Als Spaltungsprodukt der Nukleinsäure nachgewiesen von	Konstitution nachgewiesen von
	I. Alloxurbasen:	
Hypoxanthin	*A. Kossel* 1879 (Zeitschr. f. phys. Chem. III. S. 291)	6-Oxypurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2228)
Xanthin	*A. Kossel* 1880 (Zeitschr. f. phys. Chem. IV. S. 292)	2·6-Dioxypurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2235)
Guanin	*A. Kossel* 1882 (Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 7. S. 15)	2-Amino-6-oxypurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2253)
Adenin	*A. Kossel* 1885 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 18. S. 79. 1928)	6-Aminopurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2241)
	II. Pyrimidinkörper:	
Thymin	*A. Kossel* und *A. Neumann* 1894 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **27**. S. 2215)	5-Methyl-2-6-dioxypyrimidin *H. Steudel* 1901 (Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **32**. S. 241)
Uracil	*A. Ascoli* 1900 (Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **31**. S. 161)	2·6-Dioxypyrimidin *H. Steudel* 1901 (Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **32**. S. 244)
Cytosin	*A. Kossel* und *H. Steudel* 1902 (Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **37**. S. 177)	6-Amino-2-oxypyrimidin *A. Kossel* und *H. Steudel* 1903 (Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **37**. S. 377. Bd. **38**. S. 49)

hindern dann nicht die Isolierung der anderen Produkte. Aber um nur eine vollkommene Spaltung zu erreichen, ist solch ein eingreifender Prozeß nicht nötig, es genügt ein mehrstündiges Sieden mit mäßig starker Schwefelsäure unter gewöhnlichem Druck. Unter solchen Umständen zerfällt die Nukleinsäure in eine ganze Reihe von Spaltungsprodukten, die sich zweckmäßig in 3 Gruppen anordnen lassen.

1. Gruppe: Alloxurbasen: Guanin, Adenin, Xanthin, Hypoxanthin.

2. Gruppe: Pyrimidinkörper: Cytosin, Uracil, Thymin.

3. Gruppe: Kohlenhydratderivate: Ameisensäure, Lävulinsäure, ferner Ammoniak und Phosphorsäure.

Konstitution der stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte der echten Nukleinsäure.

Purinbasen.

```
      HN — CO                 N = C — NH2
      |    |                  |   |
 (H2N)C    C — NH             HC  C — NH
      ||   ||    >CH          ||  ||    >CH
      N —  C — N              N — C — N
```

Guanin $C_5H_5N_5O$.[1]
2-Amino-6-Oxypurin.

Adenin $C_5H_5N_5$.[2]
6-Aminopurin.

```
  HN — CO                 HN — CO
       |                  |    |
  OC   C — NH             HC   C — NH
  |    ||    >CH          ||   ||    >CH
  HN — C — N              N —  C — N
```

Xanthin $C_5H_4N_4O_2$.[3]
2.6-Dioxypurin.

Hypoxanthin $C_5H_4N_4O$.[4]
6-Oxypurin.

---

[1]) *A. Strecker,* Verwandlung des Guanins in Xanthin. Ann. d. Chem. Bd. **108**. S. 141 (1859). — *A. Strecker,* Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Guanin, Xanthin, Theobromin, Kaffein und Kreatinin. Ann. d. Chem. Bd. **118**. S. 151 (1861). — *E. Fischer,* Umwandlung des Xanthins in Theobromin und Kaffein. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **15**. S. 453 (1882). — *C. Wulff,* Beiträge zur Kenntnis der Nukleinbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **17**. S. 468 (1892). — *E. Fischer,* Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2253 (1897). — *E. Fischer,* Synthesen in der Puringruppe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **32**. S. 445 (1899).

[2]) *A. Kossel,* Über eine neue Base aus dem Tierkörper. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 79 (1885). — *A. Kossel,* Über das Adenin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 1928 (1885). — *A. Kossel,* Über das Adenin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **10**. S. 250 (1886). — *A. Kossel,* Über das Adenin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 241 (1888). — *G. Bruhns,* Über ein Bromierungsprodukt des Adenins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **16**. S. 4 (1892). — *M. Krüger,* Zur Kenntnis des Adenins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **16**. S. 167 (1892). — *E. Fischer,* Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2241 (1897).

[3]) *F. Wöhler* und *J. Liebig,* Untersuchungen über die Natur der Harnsäure. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **26**. S. 340 (1838). — *Scherer,* Über Hypoxanthin, Xanthin und Guanin im Tierkörper und den Reichtum der Pankreasdrüse an Leucin. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **112**. S. 257 (1859). — *G. Städeler,* Über das Xanthin. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **111**. S. 28 (1859). — *A. Strecker,* Verwandlung des Guanins in Xanthin. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **108**. S. 141 (1859). — *E. Fischer,* Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2235 (1897).

[4]) *Scherer,* Über einen im tierischen Organismus vorkommenden, dem Xanthinoxyd verwandten Körper. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **73**. S. 328 (1850). — *A. Strecker,* Verwandlung des Guanins in Xanthin. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **108**. S. 156 (1859). — *A. Kossel,* Über Xanthin und Hypoxanthin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **6**. S. 428 (1882). — *M. Krüger,* Zur Kenntnis des Adenins und Hypoxanthins. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **18**. S. 422 (1893). — *M. Krüger,* Die Konstitution des Adenins und Hypoxanthins. IV. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **18**.

Pyrimidinkörper.

```
HN — CO                    N = C.NH2
|     |
OC    C.CH3                OC    CH

HN — CH                    HN — CH
```

Thymin $C_5H_6N_2O_2$.[1] — 5-Methyl-2.6-dioxypyrimidin.

Cytosin $C_4H_5N_3O$.[2] — 2-Oxy-6-aminopyrimidin.

```
HN — CO
|     |
OC    CH
|     |
HN — CH
```

Uracil $C_4H_4N_2O_2$.[3] — 2.6-Dioxypyrimidin.

Der gesamte Phosphor der Nukleinsäure erscheint in der Zersetzungsflüssigkeit als Phosphorsäure wieder, die übrigen Spaltungsprodukte sind, wie Untersuchungen der Nukleinsäure mit anderen Methoden (Einwirkung von starker Salpetersäure[4]) resp. Salzsäure[4]) bei niederer Temperatur gelehrt haben, nicht alle primär im Molekül der Nukleinsäure vorgebildet.

S. 459 (1893). — *E. Fischer*, Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2228 (1897).

[1]) *A. Kossel* und *A. Neumann*, Über das Thymin, ein Spaltungsprodukt der Nukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **26**. S. 2753 (1893). — *A. Kossel* und *A. Neumann*, Darstellung und Spaltungsprodukte der Nukleinsäure (Adenylsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **27**. S. 2215 (1894). — *H. Steudel* und *A. Kossel*, Über das Thymin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 303 (1900). — *H. Steudel*, Über die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 539 (1900). — *H. Steudel*, Die Konstitution des Thymins. Sitzungsber. d. Marburger Ges. zur Bef. d. ges. Naturwissensch. 23. Januar 1901. — *H. Steudel*, Die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **32**. S. 241 (1901). — *E. Fischer* und *G. Roeder*, Synthese des Uracils, Thymins und Phenyluracils. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **34**. S. 3751 (1901). — *O. Gerngroß*, Über eine Synthese des Thymins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **38**. S. 3408 (1905).

[2]) *A. Kossel* und *A. Neumann*, Darstellung und Spaltungsprodukte der Nukleinsäure (Adenylsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **27**. S. 2215 (1894). — *A. Kossel* und *H. Steudel*, Über einen basischen Bestandteil tierischer Zellen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 177 (1902). — *A. Kossel* und *H. Steudel*, Über das Cytosin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 377 (1903). — *A. Kossel* und *H. Steudel*, Weitere Untersuchungen über das Cytosin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **38**. S. 49 (1903). — *H. L. Wheeler* und *T. B. Johnson*, Synthese von Aminooxypyrimidinen, 2-Amino-6-oxypyrimidin und 2-Oxy-6-aminopyrimidin. American chemical Journal. Vol. 29. p. 492 (1903).

[3]) *A. Ascoli*, Über ein neues Spaltungsprodukt des Hefenukleins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **31**. S. 161 (1900/01). — *H. Steudel*, Über die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 539 (1900). — *H. Steudel*, Die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **32**. S. 244 (1901).

[4]) *H. Steudel*, Über die Oxydation der Nukleinsäure. I. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **48**. S. 426 (1906).

sondern teilweise erst sekundär durch die Einwirkung der siedenden Schwefelsäure auf die primären Spaltungsprodukte durch Ammoniakabspaltung entstanden. So läßt sich das Xanthin auf das Guanin, das Hypoxanthin auf das Adenin und das Uracil auf das Cytosin zurückführen, ebenso ist das bei dieser desamidierenden Wirkung der Schwefelsäure freiwerdende Ammoniak ein sekundäres Zersetzungsprodukt. Man findet über das Vorkommen der einzelnen Nukleinbasen und ihre Mengenverhältnisse die widersprechendsten Angaben in der Literatur. Häufig hat man Resultate, die mit alten, unvollkommenen Methoden gewonnen waren, kritiklos neben andere gesetzt, die mit den Hilfsmitteln einer mehr und mehr vervollkommneten Technik erhalten worden sind. So könnten die Angaben mancher Lehrbücher den Anschein erwecken, als ob die größte Verwirrung in den Anschauungen über den Alloxurbasengehalt der Nukleinsäure besteht. Dazu kommt ferner, daß man früher die echte Nukleinsäure nicht streng genug von den ihr nahestehenden Substanzen (Guanylsäure, Inosinsäure) geschieden hat, die in der Tat einen anderen Alloxurbasengehalt an Qualität und Quantität haben wie die echte Nukleinsäure. Nach den Ergebnissen meiner Untersuchungen bleiben als primäre Bestandteile des Nukleinsäuremoleküls von stickstoffhaltigen Substanzen Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin übrig, die in molekularem Verhältnis in der Nukleinsäure vorkommen.

Einige Forscher hatten gemeint, offenbar beeinflußt durch theoretische Erwägungen, die durch die alte *Schmiedeberg*sche Formulierung der Nukleinsäure veranlaßt waren, daß die Pyrimidinkörper, besonders das Cytosin, sich erst sekundär aus den Purinbasen bildeten.[1]) Das ist nicht der Fall; sämtliche Versuche sprechen dagegen, speziell liefern die Alloxurbasen selbst beim Sieden mit Schwefelsäure und eventuell Zusatz eines Kohlenhydrates keine Pyrimidinkörper.[2])

Die Körper der dritten Gruppe sind Derivate einer Hexose, deren nähere Definition noch aussteht; man kann aber aus der Menge der gebildeten Lävulinsäure den Schluß ziehen, daß 4 Moleküle der Hexose in der Nukleinsäure vorhanden sind.

Von der Hexose ist bisher bekannt, daß sie bei der Spaltung mit Schwefelsäure Ameisensäure und Lävulinsäure, bei der Spaltung mit Salpetersäure Oxalsäure und Epizuckersäure liefert. Nach Abtrennung der Alloxurbasen läßt sich das Reduktionsvermögen der Hexose nachweisen, ebenso wie ihre Rechtsdrehung. Das Drehungsvermögen der Nukleinsäure selbst ist wahrscheinlich durch diese rechtsdrehende Hexose bedingt.

---

[1]) *Schmiedeberg* hatte seine Formel der Nukleinsäure nur auf 14 Stickstoffatome berechnet; zog man hiervon die 10 Atome N ab, die im Guanin und Adenin zusammen enthalten waren, so reichten die 4 übrigbleibenden nicht für den Stickstoffgehalt des Thymins und Cytosins, die zusammen 5 N-Atome haben. Diese Überlegung ist gewiß das Haupthindernis gewesen, das der allgemeinen Anerkennung des Cytosins als primären Spaltungsproduktes der Nukleinsäure anfangs im Wege gestanden hat.

[2]) *H. Steudel,* Über die Bildung von Pyrimidinderivaten aus Purinkörpern. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53. S. 508 (1907).

In manchen Lehrbüchern findet man die Angabe, daß die Nukleinsäure auch eine Pentose in ihrem Molekül enthalte. Man hat hier entweder die echte Nukleinsäure mit der Guanylsäure oder Inosinsäure verwechselt oder hat die von *Neumann* angegebene Reaktion der Nukleinsäure mit Phlorogluzin und Salzsäure auf Pentose bezogen. Aber der Ausfall der Farbenreaktion ist nicht der gleiche wie bei einer Pentose und vor allem sind die Mengen Furfurol, die sich bei der Destillation von Nukleinsäure mit Salzsäure bilden, so minimal, daß sich daraus der Schluß auf das Vorkommen einer Pentose in der Nukleinsäure nicht rechtfertigen läßt.[1])

Demnach würde sich das Bild von der Zusammensetzung der Nukleinsäure folgendermaßen gestalten:

Guanin	10·88%
Adenin	9·73%
Cytosin	7·99%
Thymin	9·08%
Hexose	51·90%
Phosphorsäure (P_2O_5)	20·46%

$$\underset{\text{Nukleinsäure}}{C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4} + 8\,H_2O + 2\,O = \underset{\text{Guanin}}{C_5H_5N_5O} + \underset{\text{Adenin}}{C_5H_5N_5} + \underset{\text{Thymin}}{C_5H_6N_2O_2} +$$

$$\underset{\text{Cytosin}}{C_4H_5N_3O} + \underset{\text{Hexose}}{4\,C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Tetrametaphosphorsäure}}{4\,HPO_3}.$$

Über die Art der Verknüpfung der einzelnen Bruchstücke untereinander ist noch nichts Sicheres bekannt; wahrscheinlich ist das Kohlenhydrat an die Phosphorsäure in ähnlicher Weise gebunden[2]), wie das Glyzerin in der Glyzerinphosphorsäure, von der Art und dem Ort der Bindung der Pyrimidinkörper weiß man nichts; von den Alloxurbasen ist nur soviel sicher, daß bei ihrer Loslösung aus dem Molekül der Nukleinsäure durch Salpetersäure die reduzierende Gruppe des Kohlenhydrates[3]) frei wird, daß also dort eine Bindung vorhanden sein muß. Ob dabei das N-Atom 7 der Purinbasen eine Rolle spielt, mag dahingestellt bleiben[4]). Jedenfalls ist es wenig wahrscheinlich, daß an das N-Atom 7 eine Phosphorbindung herantritt, da die Alloxurbasen unter dieser Voraussetzung noch an einer anderen Stelle mit dem Kohlenhydrat in Verbindung sein müßten. Nach den Untersuchungen von *H. Fischer*[5]) findet der Eintritt

[1]) *H. Steudel*, Über die Kohlenhydratgruppe in der Nukleinsäure. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **56**. S. 213 (1908); siehe auch *J. Bang*, Chemische Untersuchung der lymphatischen Organe. Beitr. z. chem. Phys. u. Path. Bd. **4**. S. 341 (1904).

[2]) *H. Steudel*, Über die Oxydation der Nukleinsäure. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **48**. S. 429. Zusatz (1906).

[3]) *H. Steudel*, Über die Kohlenhydratgruppe in der Nukleinsäure. I. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **55**. S. 410 (1908).

[4]) *R. Burian*, Zur Kenntnis der Bindung der Purinbasen im Nukleinsäuremolekül. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **37**. S. 708 (1903).

[5]) *H. Fischer*, Zur Frage der Bindung der Purinbasen im Nukleinsäuremolekül. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 69 (1909).

der Diazogruppe in die Purinbasen (Theophyllin, Xanthin, Guanin) übrigens bei Stellung 8 statt: danach könnten die Purinbasen im Nukleinsäuremolekül entweder bei 7 oder 8 gebunden sein.

Endlich scheinen die Amidogruppen der Purin- und Pyrimidinbasen nicht endständig und frei im Molekül der Nukleinsäure vorhanden zu sein, da bisher noch keine Verbindungen der Nukleinsäure mit Säuren beobachtet sind.

Die Purinbasen sind nur äußerst locker im Verbande des Nukleinsäuremoleküls befestigt. Durch Behandlung freier Nukleinsäure mit starker Salpetersäure oder Salzsäure in der Kälte respektive bei Zimmertemperatur kann man leicht die gesamten Purinbasen als Nitrate respektive Chloride abspalten. Man erhält dann im Filtrat einen Körper, der noch die gesamte Phosphorsäure in organischer Bindung enthält: hatte man Salpetersäure zur Abspaltung der Basen angewandt, so reduziert das Filtrat kräftig *Fehling*sche Lösung, ein Zeichen, daß die Basen irgendwie mit der reduzierten Gruppe des Kohlenhydrates in der unzersetzen Nukleinsäure in Verbindung sein müssen. Wendet man zur Aufspaltung starke Salzsäure an, so bräunt sich die Zersetzungsflüssigkeit sehr bald und sie reduziert nicht. Hier wird die Kohlehydratgruppe rasch weiter verändert, man erhält zum Schluß Melanin und Lävulinsäure.

Man findet häufig in der Literatur irrtümlicherweise [1]) angegeben, daß die Pyrimidinkörper erst bei tiefgreifender Spaltung aus dem Molekül der Nukleinsäure hervorgingen. Veranlaßt ist diese falsche Ansicht wahrscheinlich dadurch, daß *Kossel* und *Neumann* im Anfang sich eines Zersetzungsverfahrens mit Schwefelsäure bei 150° bedient haben, um Cytosin und Thymin zu isolieren. Dies Verfahren war aber nur gewählt, um einfachere Bedingungen in der zu untersuchenden Flüssigkeit zu haben — das Guanin und Adenin wird auf diese Weise wohl zerstört, aber nicht in Cytosin verwandelt, wie man fälschlich geglaubt hat.

Den nach Entfernung der Alloxurbasen verbleibenden Körper hat man Thyminsäure genannt. Seine Gewinnung ist von *Kossel* [2]) und *Neumann* beschrieben worden, eine nähere Untersuchung steht noch aus.

Darstellung der Thyminsäure.

Man erwärmt auf einem Wasserbade 500 *cm*³ Wasser in einem Becherglase. Wenn die Wasserbadtemperatur erreicht ist, so gibt man 10 *g* Nukleinsäure in der Weise hinzu, daß nichts an den Wandungen des Gefäßes hängen bleibt, erhitzt etwa 10 Minuten unter Umrühren weiterhin auf dem

[1]) *R. Burian,* Pyrimidinderivate aus Purinbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **51.** S. 438. — *O. Schmiedeberg,* Beiträge zur Kenntnis der tierischen Nukleinsäure. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **57.** S. 330. „Bei der Einwirkung konzentrierterer Säuren in der Siedehitze wird die Nukleinsäure nicht hydrolytisch gespalten, sondern geradezu zertrümmert, wobei auch Reduktionsvorgänge beteiligt sind."

[2]) *A. Kossel* und *A. Neumann,* Über Nukleinsäure und Thyminsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **22.** S. 74 (1896).

Wasserbade und gießt die trübe Flüssigkeit durch ein Faltenfilter. Man prüft nun das Filtrat, indem man eine Probe desselben im Reagenzglas mit 1 Tropfen Salzsäure versetzt. Es darf kein Niederschlag von Nukleinsäure entstehen, sonst hat man zu kurze Zeit erhitzt und muß die Flüssigkeit für einige Minuten aufs Wasserbad zurückbringen. Darauf fügt man zu der Probe Barytwasser im Überschuß, es darf sich kein Baryumphosphat abscheiden, sonst hat man zu lange erhitzt und ein Teil der Thyminsäure ist unter Abspaltung von Phosphorsäure weiter zerlegt worden. Man setzt zu dem Filtrat kalt gesättigtes Barytwasser bis zur bleibend schwach alkalischen Reaktion hinzu und läßt bis zum nächsten Tage stehen. Die Flüssigkeit trübt sich langsam und scheidet sämtliches Guanin (vermischt mit Baryumkarbonat) ab. Die vom Guanin abfiltrierte Lösung wird in die $1^{1}/_{2}$fache Menge Alkohol hineingegossen. Entsteht kein Niederschlag, sondern nur eine milchige Trübung, so fügt man einige Tropfen einer wässerigen Lösung von Chlorbaryum hinzu. Man läßt bis zum nächsten Tage stehen, damit das durch das Erhitzen auf dem Wasserbade abgespaltene Adenin und Cytosin vollständig in den Alkohol hineingehen. Der thyminsaure Baryt hat sich in etwas klebrigen Massen am Boden des Gefäßes abgeschieden. Er wird im Gefäß mit Alkohol ausgewaschen und sodann in etwa 200 cm^3 Wasser gelöst. Diese Lösung gießt man in die dreifache Menge Alkohol und fügt nötigenfalls etwas Chlorbaryum hinzu, um eine vollständige Abscheidung des Niederschlages zu bewirken. Man wiederholt dies Umlösen so lange, bis man eine rein weiße, pulverige Fällung erhält.

Die Analysen *Kossels* und *Neumanns* ließen eine Formel berechnen: $C_{16}H_{25}N_3P_2O_{12}$, die verdoppelt ($C_{32}H_{50}N_6P_4O_{24}$) annähernd der Formel entsprechen würde, wenn die Thyminsäure sich aus der Nukleinsäure $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$ durch Austritt von 1 Molekül Guanin und 1 Molekül Adenin hydrolytisch bilden würde; hierfür berechnet sich $C_{33}H_{51}N_5P_4O_{31}$. Eine ähnliche Formel gibt auch *Schmiedeberg*[1]) an: $C_{30}H_{46}N_4P_4O_{25}$. Genau kann die Formel der experimentell dargestellten Thyminsäure nicht mit der von der Theorie geforderten stimmen, da sich aus der Nukleinsäure bei der Darstellung auch etwas Cytosin abspaltet.

Läßt man nun auch noch Thymin oder Cytosin aus dem Verbande der Nukleinsäure austreten, so kann man hierfür ebenfalls hypothetische Formeln ableiten, die bisher aber experimentell nicht bewiesen sind. Ebenso mangelhaft ist unsere Kenntnis der Körper, die durch ganz geringe Veränderungen der ursprünglichen Nukleinsäure entstehen. Daß die nicht gelatinierende Form b der Nukleinsäure ein Depolymerisationsprodukt der gelatinierenden a ist, ist äußerst wahrscheinlich und wird allgemein und ohne Widerspruch angenommen; streng bewiesen ist es aber noch nicht. Über die Stellung und den besonderen Charakter eines anderen Zwischenproduktes, der Nukleothyminsäure, herrscht gänzliche Unklarheit.

---

[1]) *O. Schmiedeberg*, Über die Nukleinsäure aus der Lachsmilch. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **43**. S. 72 (1899). — *C. L. Alsberg*, Beiträge zur Kenntnis der Nukleinsäure. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **51**. S. 239 (1904).

Darstellung der Nukleothyminsäure.[1])

Zur Darstellung der Nukleothyminsäure wird freie Nukleinsäure unter heftigem Rühren in der zwanzigfachen Menge Wasser von 60° so schnell wie möglich gelöst, die Lösung filtriert und nach völligem Erkalten in die dreifache Menge Alkohol gegossen, dem man pro Liter etwa 15 cm^3 konzentrierte Salzsäure hinzugefügt hat. Man erhält einen weißen Niederschlag, welcher säurefrei gewaschen, in kaltem Wasser gelöst und wieder durch alkoholische Salzsäure gefällt wird. Die Nukleothyminsäure ist in Wasser ziemlich leicht löslich, enthält aber noch Alloxurbasen in ihrem Molekül zum Unterschied von der Thyminsäure.

Darstellung der Spaltungsprodukte der Nukleinsäure.

Zur Gewinnung der Alloxurbasen aus der Nukleinsäure ist die Spaltung mit Salpetersäure resp. starker Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur am besten geeignet.

Spaltung mit starker Salpetersäure.[2])

Lufttrocknes nukleinsaures Kupfer resp. freie Nukleinsäure (z. B. 10 *g*) wird mit einer Salpetersäure vom spez. Gew. 1·2 (20 cm^3) übergossen (10 cm^3 konzentrierter Salpetersäure spez. Gew. 1·4 + 10 cm^3 Wasser). Es fällt die freie Nukleinsäure als zähe Masse zu Boden und es beginnt allmählich eine langsame und stetige Gasentwicklung der niederen Oxyde des Stickstoffs, wobei die Nukleinsäure nach und nach in Lösung geht. Nach 24 Stunden ist sie fast ganz verschwunden und an ihrer Stelle findet sich ein reichlicher kristallinischer Bodensatz, über dem eine etwas visköse Flüssigkeit steht. Öfteres Reiben mit einem Glasstabe befördert die Abscheidung der Kristalle. Trennt man nach mehrtägigem Stehen den Bodensatz von der Flüssigkeit, so erhält man ein grauweißes Pulver, das mit verdünnter Salpetersäure gewaschen, mit Alkohol und Äther getrocknet werden kann. Man löst sodann die Kristalle vorsichtig in heißem Wasser und übersättigt mit Ammoniak, wobei man einen dichten, weißen, amorphen Niederschlag von Guanin erhält, den man eine Zeit auf dem Wasserbade digeriert und dann filtriert. Durch Auflösen in Natronlauge und Wiederausfällen mit Essigsäure kann man das Guanin genügend rein erhalten. Das ammoniakalische Filtrat vom Guanin wird auf dem Wasserbad zur Trockne gebracht, mit Wasser aufgenommen und mit pikrinsaurem Natron ausgefällt. Das ausfallende Adeninpikrat soll einen Schmelzpunkt von 280° zeigen und muß nötigenfalls umkristallisiert werden durch Lösen in einer gemessenen Menge Natronlauge von bekanntem Gehalt, Filtrieren und Wiederausfällen durch Zusatz einer entsprechenden Menge Salzsäure.

[1]) *A. Neumann*, Verfahren zur Darstellung der Nukleinsäuren a und b und der Nukleothyminsäure. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. Supplementband S. 552 (1899).

[2]) *H. Steudel*, Über die Oxydation der Nukleinsäure. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48. S. 426 (1906).

Die nach der Kristallisation der Nitrate der Alloxurbasen verbleibende Flüssigkeit läßt sich bei niederer Temperatur des Wasserbades von der Salpetersäure durch wiederholtes Abdampfen annähernd befreien. Wenn die Alloxurbasen als Nitrate nicht gleich im Anfang quantitativ abgetrennt worden sind, kann an dieser Stelle Xanthin- und Hypoxanthinnitrat auskristallisieren. Nach dem Auflösen in Wasser und nach Entfernung der Phosphorsäure mit Barytwasser, des überschüssigen Baryt mit CO_2 erhält man eine Lösung, die beim Einengen Thymin und Uracil auskristallisieren läßt. Saugt man diese Kristalle ab, so läßt Zusatz von Alkohol zu dem nunmehrigen Filtrat epizuckersaures Baryum[1]) als amorphen, flockigen Niederschlag ausfallen; diesen kann man zur Reinigung wiederholt in Wasser auflösen und mit Alkohol wieder ausfällen (es zeigt dabei eine große Neigung, in wässeriger Lösung zu gelatinieren), dann den Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernen, die freie Säure mit Chinin neutralisieren, um so das in schönen Nadeln kristallisierende Chininsalz[2,3]) der Epizuckersäure zu erhalten, das in kaltem Wasser schwer, in heißem leicht löslich ist und sich gut zur Reindarstellung der Epizuckersäure eignet.

Hat man eine Zersetzungsflüssigkeit von Nukleinsäure aufzuteilen, die durch Hydrolyse mit z. B. siedender Schwefelsäure erhalten wurde, so empfiehlt sich folgender Gang der Analyse:

Spaltung mit siedender Schwefelsäure.[4])

Zunächst wird die Schwefelsäure und die Phosphorsäure durch Zusatz von heißem Barytwasser, solange noch ein Niederschlag entsteht, vollkommen ausgefällt. Das Baryumsulfat und -phosphat wird mit Wasser in einer Reibschale zu einem dünnen Brei angerührt und in einem guten Emailtopf mit Wasser dreimal sorgfältig ausgekocht. (Es ist sehr schwer, das Guanin aus diesem Niederschlag wieder herauszubekommen.) Die ablaufenden Filtrate werden auf ein handliches Volumen konzentriert, mit Schwefelsäure auf einen Gehalt von etwa 5% gebracht und in dem von *Kutscher* und *Steudel*[5]) angegebenen Ätherextraktionsapparat einer energischen Ätherextraktion unterworfen. In das Ätherextrakt geht die Lävulinsäure und ein Teil des Thymins hinein. Sobald der Äther nichts Wesentliches mehr aufnimmt, läßt man den Äther aus der Extraktionsflüssigkeit durch mäßiges Erwärmen verdunsten und fällt aus der erkalteten Lösung die Basen mit Phosphorwolframsäure heraus. Hierbei ist zum Schluß sehr vorsichtig zu verfahren, die Fällung soll

[1]) *H. Steudel*, Über die Oxydation der Nukleinsäure. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **50**. S. 538 (1907).

[2]) *H. Steudel*, Zur Analyse der Nukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **52**. S. 62 (1907).

[3]) *H. Steudel*, Die Zusammensetzung der Nukleinsäuren aus Thymus und aus Heringssperma. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **53**. S. 15 (1907).

[4]) *H. Steudel*, Zur Kenntnis der Thymusnukleinsäuren. I, II, III. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 135 (1904). Bd. **43**. S. 402 (1904). Bd. **46**. S. 332 (1905).

[5]) *Fr. Kutscher* und *H. Steudel*, Beschreibung eines Ätherextraktionsapparates. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 473 (1903).

vollständig sein, aber ein Zuviel von Phosphorwolframsäure läßt auch das Thymin mit in den Niederschlag hineingehen, dessen weitere Verarbeitung es nachher stören würde. Man hört zweckmäßig mit dem Zusatz des Fällungsmittels auf, sobald der Niederschlag anfängt, seine dickflockige Beschaffenheit zu verlieren und feinpulverig wird. Niederschlag und Flüssigkeit werden durch Absaugen getrennt und der Niederschlag durch wiederholtes Anreiben in der Reibschale mit 5 Volumprozent H_2SO_4-haltigem Wasser und Absaugen gewaschen.

I. Verarbeitung des Niederschlages.

In ihm sind die Alloxurbasen und das Cytosin enthalten. Man reibt den Niederschlag mit heißem Wasser zu einem dünnen Brei an, den man in einer großen Porzellanschale auf dem Wasserbade warm hält, und setzt portionsweise heißgesättigte Barytlösung hinzu, bis sämtliche Phosphorwolframsäure an Baryt gebunden ist. Dies zeigt sich durch einen Farbenumschlag von Blau in Gelb in der Flüssigkeit an; man erwärmt zum Schluß noch einige Zeit weiter, um die Umsetzung ganz zu vollenden; dann gibt der in der Flüssigkeit vorhandene überschüssige Baryt in einer herausgenommenen Probe einen dicken Niederschlag von $BaCO_3$ mit einer Lösung von Natriumkarbonat. Der phosphorwolframsaure Baryt wird abgesaugt und dreimal mit heißem Wasser angerieben und ausgekocht, aus den eingeengten Filtraten der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure vorsichtig unter Vermeidung eines Überschusses entfernt, dann mit Salpetersäure schwach sauer gemacht und mit einer 20%igen Silbernitratlösung eine Fällung der Alloxurbasen erzeugt.

a) Fällung der Alloxurbasen.[1])

Die Fällung wird auf einem Falterfilter gesammelt und, sobald der größte Teil der Flüssigkeit abgelaufen ist, auf der Saugpumpe scharf abgesaugt und mit silbernitrathaltigem Wasser gewaschen. Man bringt dann den Niederschlag in stark ammoniakhaltiges Wasser und digeriert ihn hiermit einige Zeit in der Wärme. Dabei gehen die Silbernitratverbindungen der Alloxurbasen in die Silberverbindungen über; sie werden abgesaugt und so lange mit ammoniakhaltigem Wasser gewaschen, bis sie salpetersäurefrei sind. Dies ist sehr wichtig, weil die Salpetersäure sonst leicht die weitere Verarbeitung stören kann. Der Filterrückstand wird nunmehr in siedendem Wasser fein verteilt, durch Zusatz von Salzsäure das Silber ausgefällt und die Basen in ihre Chloride verwandelt, das Chlorsilber abgesaugt und das Filtrat auf dem Wasserbade vorsichtig zur Trockne gebracht, zum Schluß bei niederer Temperatur und unter häufigem Umschwenken der Schale. Die Masse wird nun mit Wasser siedend heiß gelöst und in der Wärme mit 10%igem Ammoniak im Überschuß versetzt.[2]) Der sofort ent-

[1]) *M. Krüger* und *G. Salomon*, Die Alloxurbasen des Harnes. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **26**. S. 373 (1898).

[2]) *M. Krüger* und *A. Schittenhelm*, Die Purinkörper der menschlichen Fäces. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **35**. S. 153 (1902).

stehende Niederschlag von Guanin wird nach 24stündigem Stehen abfiltriert, noch einmal mit 2%igem Ammoniak in der Wärme digeriert, wiederum abfiltriert und endlich zur Reinigung in verdünnter Natronlauge gelöst und durch Ansäuern der alkalischen Lösung mit Essigsäure wieder ausgefällt. Zur Identifizierung kann das Guanin in das in langen Nadeln kristallisierende Sulfat übergeführt werden.

Die ammoniakalischen Filtrate vom Guanin werden zur Trockne gebracht, nach Entfernung des Ammoniaks mit schwach salzsäurehaltigem Wasser aufgenommen und mit einer gesättigten Lösung von Natriumpikrat so lange versetzt, als noch ein weiterer Zusatz des Fällungsmittels zu einem Teile des Filtrates sofort eine Fällung erzeugt. Der Niederschlag von pikrinsaurem Adenin wird sofort mit Hilfe einer Saugvorrichtung abfiltriert. Zur Reinigung wird das Adeninpikrat in heißem Wasser unter Zusatz der berechneten Menge Normalnatronlauge gelöst, dann die der Lauge entsprechende Menge an Normalsalzsäure hinzugefügt und diese Lösung mit Tierkohle behandelt. Aus dem Filtrate scheidet sich dann das Adeninpikrat in langen, glänzenden Nadeln ab. F. P. 281°.

Der Rest der neben Guanin und Adenin vorhandenen Basen wird aus dem ammoniakalisch gemachten Filtrate vom Adeninpikrat durch ammoniakalische Silberlösung ausgefällt. Der gut mit ammoniakalischem Wasser salpetersäurefrei gewaschene Niederschlag wird mit Salzsäure zersetzt, das Chlorsilber entfernt, die Lösung der Chloride vorsichtig zur Trockne gebracht und die überschüssige Salzsäure durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser unter häufigem Umschwenken der Schale und zum Schluß bei niederer Temperatur entfernt. Digeriert man nun den Rückstand mit Wasser bei 40°, so geht das Hypoxanthinchlorid völlig in Lösung, während das Xanthin größtenteils ungelöst zurückbleibt. Zur Identifizierung wird es in das schwer lösliche Nitrat verwandelt. Das Hypoxanthin wird mit Hilfe seines pikrinsauren Salzes gereinigt und dann in das Nitrat verwandelt.

b) Cytosinfällung.

Die von den Silbernitratverbindungen der Alloxurbasen abgelaufene Flüssigkeit enthält das Cytosin[1]); man erhält es in Form seiner Silberverbindung, wenn man die schwach saure Flüssigkeit so lange mit weiteren Mengen von Silbernitratlösung versetzt, bis eine herausgenommene Probe, in Barytwasser hineingetropft, nicht mehr einen weißen, sondern einen schwarzbraunen Niederschlag von Silberoxyd ausfallen läßt. Ist dieser Punkt erreicht, so wird die Flüssigkeit solange mit Barytwasser versetzt, bis sie gegen Phenolphtalein anfängt alkalisch zu reagieren. Den Niederschlag saugt man ab, wäscht ihn gründlich mit schwachem Barytwasser aus, zersetzt ihn mit Salzsäure, bringt etwa vorhandenes Baryum im Filtrat durch Schwefelsäure zur Abscheidung und fällt das Cytosin mit

[1]) *F. Kutscher,* Eine Methode zur Darstellung des Cytosins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38. S. 170 (1903).

Platinchlorid oder Natriumpikrat aus. Letzteres wird wie das Adenin umkristallisiert. Andere Körper sind in dieser Fraktion nicht enthalten. das vom Cytosinsilber ablaufende Filtrat enthält keine mit Phosphorwolframsäure fällbaren Basen mehr.

II. Verarbeitung des Filtrats von der Phosphorwolframsäurefällung.

Die überschüssige Phosphorwolframsäure und die Schwefelsäure werden wie im Anfang mit Baryt entfernt, der Niederschlag quantitativ ausgekocht. aus dem Filtrat das Baryum quantitativ mit Schwefelsäure niedergeschlagen und die Lösung eingeengt. Es kristallisiert das Thymin aus, das aus Alkohol umkristallisiert werden kann. Die letzten Fraktionen der Kristallisationen enthalten das Uracil; seine Gewinnung in reinem Zustande ist sehr umständlich und mit großen Verlusten verbunden. Eine Methode, Thymin und Uracil besser zu trennen, ist von *T. B. Johnson*[1]) angegeben, doch stehen Erfahrungen darüber noch aus.

Will man nur einzelne der Spaltungsprodukte aus der Zersetzungsflüssigkeit isolieren, so lassen sich die obigen Vorschriften zweckmäßig abändern. Will man die Alloxurbasen allein haben, so lassen sie sich aus der ammoniakalisch gemachten Zersetzungsflüssigkeit. die durch Kochen mit Mineralsäuren erhalten wurde. mit ammoniakalischer Silberlösung ausfällen, viel leichter und bequemer aber erhält man sie durch Spaltung der Nukleinsäure mit Salpetersäure; will man Thymin und Cytosin haben, so ist es zweckmäßig, die Alloxurbasen durch Spaltung mit Schwefelsäure unter Druck zu zerstören, dann die Schwefelsäure und die Phosphorsäure mit Baryt herauszuschaffen und aus der nachher mit Salpetersäure schwach angesäuerten Flüssigkeit Thymin und Cytosin mit Silber und Baryt zu fällen nach der oben beschriebenen Methode. Die Angabe von *Jones*[2]), daß zur Fällung des Thymins sehr viel weniger Silber ausreiche, hat einer Nachprüfung nicht Stand gehalten. Als ich mir das Thymin für meine Untersuchungen über seine Konstitution darstellte, fand ich, daß man große Verluste hat, wenn man nicht so viel Silbernitrat zusetzt, bis gegen Barytwasser freies Silberoxyd ausfällt. Leichter läßt sich auch hier aus der Zersetzungsflüssigkeit mit Salpetersäure das Thymin ohne Anwendung von Silber und Baryt gewinnen. Das Cytosin kann man eventuell aus schwach 3—4%iger schwefelsaurer Lösung mit Quecksilbersulfat fällen.[3])

[1]) *Treat B. Johnson*, Eine Methode zur Trennung von Thymin und Uracil. Journal of Biological Chemistry. Vol. 4. pag. 407 (1908).

[2]) *W. Jones*, Über die Darstellung des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 461 (1900).

[3]) *A. Kossel* und *H. Steudel*, Weitere Untersuchungen über das Cytosin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38. S. 49 (1903).

Bemerkungen.

Zu der Verarbeitung der Fraktion der Alloxurbasen wäre noch folgendes zu bemerken:

Von *Krüger*[1]) ist seinerzeit empfohlen worden, statt des Silberverfahrens die Alloxurbasen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit niederzuschlagen; diese Methode ist häufig angewandt worden und wird jetzt noch vielfach benutzt. Handelt es sich aber um Untersuchungen, in denen auch die etwaigen Filtrate noch verarbeitet werden sollen, so ist die Methode schon an und für sich nicht anwendbar; nach meinen Erfahrungen ist sie aber auch sonst äußerst schwierig, da sich das Ende der Fällung nur sehr schwer beurteilen und der Zusatz der einzelnen Reagenzien sich nur bei sehr großer Erfahrung einigermaßen dosieren läßt. Vor dieser Kupfersulfatbisulfitmethode kann daher nur gewarnt werden. Freilich ist auch das Silberverfahren zur Ausfällung der Alloxurbasen nicht vollkommen, die Fällung ist vor allem nicht absolut quantitativ und die schwierige und langwierige Trennung der einander so ähnlichen Nukleinbasen erfordert große Geduld und Geschicklichkeit. Man hat die quantitative Genauigkeit der Methode sicher weit überschätzt: die in ihren Fällungsverhältnissen fast gleichen Basen Guanin und Adenin lassen sich absolut rein nur mit relativ großen Verlusten voneinander trennen. Man benutzt zu ihrer Scheidung allgemein die verschiedene Löslichkeit der beiden Substanzen in Ammoniak und wiederholt diese Fraktionierung meist zweimal, aber einerseits ist das Guanin nicht absolut unlöslich in Ammoniak — nach *Wulff*[2]) lösen:

100 *cm*³ Ammoniak von	1%	0·009 *g*	Guanin
100 „ „ „	3%	0·015 „	„
100 „ „ „	5%	0·019 „	„

und auf der anderen Seite fällt bei längerem Stehen in ammoniakalischer Lösung ein großer Teil des Adenins aus, das eigentlich gelöst bleiben sollte.[3]) Auch die Trennung von Xanthin und Hypoxanthin ist keineswegs schon bei der ersten Fraktionierung vollkommen und erfordert ein mehrmaliges Wiederholen derselben Operation, wobei natürlich jedesmal ein beträchtlicher Teil verloren geht. Sobald man nur kleine Mengen aufzuteilen hat, ist eine exakte quantitative Bestimmung überhaupt unmöglich, ebenso wie das Vorherrschen einer einzigen Nukleinbase in dem Gemenge zu einer jedesmal sinngemäßen Abänderung des Verfahrens zwingen würde.

---

[1]) *M. Krüger*, Über die Fällbarkeit der Harnsäure und der Basen der Harnsäuregruppe als Kupferoxydulverbindungen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **18**. S. 351 (1893). — Derselbe, Das Verhalten von Harnsäure, Adenin und Hypoxanthin zu Kupfersulfat und Natriumsulfit, respektive Natriumthiosulfat. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 170 (1894).

[2]) *C. Wulff*, Beiträge zur Kenntnis der Nukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **17**. S. 505 (1892).

[3]) *A. Kossel*, Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkernes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 251 (1886).

Abbau der Nukleinsäure durch Fermente.

Über den Abbau der Nukleinsäure durch Fermente liegen bisher wenige Untersuchungen vor. Die Methodik schließt sich durchaus der sonst beim Studium der Fermente üblichen an. Es wird ein Wasserextrakt des zu untersuchenden Organs hergestellt und aus ihm eventuell durch Fällung mit Ammonsulfat usw. ein fermentativ wirksamer Niederschlag gewonnen, der nun in Wasser gelöst und zu dem die zu prüfende Substanz hinzugesetzt wird. Da bei der Selbstverdauung der Thymusdrüse[1], der Hefe[1] und des Pankreas[1] die Zersetzungsprodukte der Nukleinsäure aufgefunden worden sind, so müssen selbstverständlich Fermente existieren, die die Nukleinsäure abbauen — Nukleasen. So läßt sich aus dem Pankreas neben dem Trypsin nach *Sachs*[2] eine Nuklease extrahieren, die ebenfalls in der Thymusdrüse, in der Darmschleimhaut[3], in der Hefe, in Schimmelpilzen[4] und in vielen anderen Mikroorganismen[5] vorhanden ist. Reines Trypsin[6] und reines Erepsin[7] sind gänzlich wirkungslos auf Nukleinsäure. Um wirksame Lösungen zu erhalten, wird das fein zerhackte Organ, z. B. Pankreas, mit Sand verrieben, mit der Handpresse ausgepreßt, der ausgepreßte Saft mit dem doppeltem Volumen Wasser verdünnt und filtriert.

Solche Extrakte verwandeln zunächst die gelatinierende Nukleinsäure in die nicht gelatinierende Form und sehr bald lassen sich abgespaltene Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung, Phosphorsäure mit Magnesiamixtur nachweisen. Das Reduktionsvermögen solcher Extrakte gegen *Fehling*sche Lösung (nach Entfernung der Alloxurbasen) nimmt stark zu.[6])

[1]) *F. Kutscher*, Chemische Untersuchungen über die Selbstgärung der Hefe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **32**. S. 59 (1900). — Derselbe, Das proteolytische Enzym der Thymusdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **34**. S. 114 (1901). — Derselbe, Über das Antipepton. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **25**. S. 195 (1898); Bd. **26**. S. 110 (1898) und Bd. **28**. S. 88 (1899).

[2]) *F. Sachs*, Über die Nuklease. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 337 (1905).

[3]) *T. Araki*, Über enzymatische Zersetzung der Nukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **38**. S. 84 (1903).

[4]) *L. Iwanoff*, Über die fermentative Zersetzung der Thymonukleinsäure durch Schimmelpilze. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 31 (1903).

[5]) *H. Plenge*, Über die a-nukleinsaures Natron lösende Wirkung einiger Mikroorganismen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 190 (1903). — *A. Schittenhelm* und *F. Schröter*, Über die Spaltung der Hefenukleinsäure durch Bakterien. I. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 203 (1903). II. Mitteilung. Bd. **40**. S. 62 (1903). III. Mitteilung. Bd. **40**. S. 70 (1903). IV. Mitteilung. Bd. **41**. S. 284 (1904).

[6]) *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm*, Der Ab- und Aufbau der Nukleinsäuren im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **47**. S. 452 (1906). — *H. Steudel*, Über die Kohlenhydratgruppe in der Nukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **55**. S. 408 (1908).

[7]) *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm*, l. c. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **47**. S. 452 (1906). — *H. Steudel*, bisher nicht publizierte Beobachtung. — *M. Nakayama*, Über das Erepsin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **41**. S. 348 (1904).

Verbindungen, in denen die einzelnen Spaltungsprodukte der Nukleinsäure am besten identifiziert werden:

1. Guanin. Entweder als freie Base, $C_5H_5N_5O$, MG. = 151·09, l. M. = 17923. C = 39·71%, H = 3·33%, N = 46·36%: oder besser als Sulfat: $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 + 2H_2O$. MG. = 436·29. l. M. = 63978. H_2O = 8·26% (bei 140° getrocknet). H_2SO_4 = 22·48%. N = 32·11%.

Auf kristallwasserfreies Salz berechnet: $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4$.
MG. = 400·26. l. M. = 60235. C = 29·98%. H = 3·02%. N = 35·00%. H_2SO_4 = 24·50%.

Das Guaninsulfat zersetzt sich mit Wasser in freies Guanin und in Schwefelsäure, die noch etwas Guanin gelöst hält. Gibt in sodaalkalischer Lösung mit einer Lösung frisch bereiteter Diazobenzolsulfosäure intensive Rotfärbung.[1])

Darstellung der Diazobenzolsulfosäure[2]): 2 *g* feingepulverte Sulfanilsäure werden mit 3 *cm*³ Wasser und 2 *cm*³ konzentrierter Salzsäure zu einem Brei geschüttelt und in kleinen Portionen innerhalb einer Minute mit einer Lösung von 1 *g* frischem Kaliumnitrit in 1—2 *cm*³ Wasser versetzt, wobei nach jedem Zusatz mit kaltem Wasser gekühlt wird. Die Sulfanilsäure geht größtenteils rasch in Lösung und an ihre Stelle tritt alsbald ein dichter, weißer, kristallinischer Niederschlag von Diazobenzolsulfosäure, der nach einigen Minuten abgesaugt und mit wenig Wasser ausgewaschen wird. Unveränderte Sulfanilsäure beeinträchtigt die Reaktion nicht.

Die *Weidel*sche Probe fällt beim Guanin negativ aus.

*Weidel*sche Probe: Man löst ein wenig Substanz in frisch bereitetem Chlorwasser in der Wärme in einer Porzellanschale, dampft die Lösung im Wasserbade zur Trockne und setzt den weißen oder schwach gelben Rückstand unter einer Glocke einer Ammoniakatmosphäre aus. Bei positivem Ausfall dunkelrosarote bis purpurrote Färbung, die in zweifelhaften Fällen durch leichtes Anwärmen und Betupfen mit wenig Ammoniak deutlicher gemacht werden kann. Zusatz von Natron- oder Kalilauge (in der Wärme) gibt eine blauviolette Farbe. (Die Probe ist eine Murexidprobe) (siehe dazu S. 593).

Die Xanthinprobe mit Salpetersäure fällt positiv aus.

Xanthinprobe: Eine kleine Menge Substanz wird in wenig Salpetersäure 1·12 spez. Gew. heiß gelöst in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Es hinterbleibt bei positivem Ausfall der Probe ein zitronengelber Fleck, der sich in Kali- oder Natronlauge mit etwas dunklerer gelber Farbe löst und beim Erwärmen sich violettrot färbt und einen purpurroten Rückstand hinterläßt. Bei längerem Trocknen auf dem Wasser-

[1]) *R. Burian*, Diazoaminoverbindungen der Imidazole und der Purinsubstanzen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **37**. S. 698 (1904).

[2]) *H. Pauly*, Über die Konstitution des Histidins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 516 (1904).

bade färbt sich der beim Abdampfen der Salpetersäure erhaltene gelbe Rückstand meist rötlich, sobald die zu untersuchende Substanz auch nur Spuren von Chlor[1]) oder eines Chlorides enthielt. Ammoniak liefert dann beim Befeuchten eine dunkelrosenrote bis purpurne Färbung. Kalilauge eine blauviolette Farbe (Murexidprobe), siehe dazu S. 593.

Unter dem Mikroskop zeigt das salzsaure Guanin vierseitige, schlanke Säulen, die Auslöschungsrichtung bildet mit den Kanten in den meisten Fällen einen Winkel von 27°, bei einzelnen beobachtet man auch einen solchen von 30°.[2])

2. Adenin: Pikrat: $C_5H_5N_5 . C\ H_3N_3O_7$. MG. = 364·14, l. M. = 56127. Schmelzpunkt 280° (unkorr.). C = 36·25%, H = 2·21%, N = 30·78%.

Fällt beim Umkristallisieren kristallwasserfrei in makroskopischen Prismen aus. Löslichkeit in Wasser 1:3500 bei Zimmertemperatur.

Sulfat: $(C_5H_5N_5)_2H_2SO_4 + 2H_2O$, MG. = 404·29, l. M. = 60669, H_2O = 8·91% (bei 110° getrocknet), N = 34·65%, H_2SO_4 = 24·26%. Löslichkeit in Wasser 1 : 153 bei Zimmertemperatur. Zersetzt sich nicht beim Umkristallisieren.

Das wasserfreie Salz $(C_5H_5N_5)_2H_2SO_4$, MG. = 368·26, l. M. = 56616, verlangt: C = 32·59%, H = 3·28%, N = 38·04%, H_2SO_4 = 26·63%.

Zur Erkennung kleiner Adeninmengen eignet sich das Salz mit Goldchlorid, das unter dem Mikroskop charakteristische Formen zeigt. Die Auslöschungen liegen bei den Skelettformen sowie bei den prismatischen Gestalten parallel der Längsrichtung. Die Kristalle des salzsauren Salzes sind derbe Prismen, die oft einen Winkel von 137° zeigen.[2])

Das Adenin gibt in sodaalkalischer Lösung keine Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure[3]). *Weidel*sche Reaktion und Xanthinprobe fallen negativ aus.

3. Xanthin wird identifiziert am besten als freie Base. Es fällt entweder amorph wasserfrei aus oder kristallisiert mit 1 Mol. Kristallwasser, das es bei 125—130° abgibt. Löslich in 13.000—14.000 Teilen kaltem, in 1300—1400 heißem Wasser, schwer löslich in Alkohol, leicht löslich im Überschuß von Ammoniak und Alkalihydrat.

$C_5H_4N_4O_2$, MG. = 152·07, l. M. = 18204, 39·46% C, 2·65% H, 36·85% N.

Es gibt die Xanthin- und die *Weidel*sche Probe.

4. Hypoxanthin erkennt man ebenfalls am besten als freie Base, farblose, mikroskopische Kristalle, löslich in etwa 1400 Teilen kalten, in 70 Teilen heißen Wassers, fast unlöslich in Alkohol, leicht löslich in verdünnten Säuren und Laugen.

---

[1]) *M. Stadthagen*, Über das Vorkommen der Harnsäure in verschiedenen tierischen Organen, ihr Vorkommen bei Leukämie und die Frage ihrer Entstehung aus den Stickstoffbasen. *Virchows* Archiv. Bd. **109**. S. 395 (1887).

[2]) *Behrens, Kossel* und *Schiefferdecker*, Das Mikroskop und die Methoden der mikroskopischen Untersuchung. Braunschweig. Harald Bruhn. 1889. S. 278, 280.

[3]) *H. Steudel*, Über die Oxydation der Nukleinsäure. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **48**. S. 428 (1906).

$C_5H_4N_4O$, MG. = 136·07, l. M. = 13376, 44·09% C, 2·96% H, 41·19% N:

oder als in Salpetersäure schwerlösliches Nitrat:

$$C_5H_4N_4O \cdot HNO_3 + H_2O.$$

Gibt sein Kristallwasser bei 105° ab. 8·29% H_2O.

Bei 120° gibt das Salz schon Salpetersäure ab.

$C_5H_4N_4O \cdot HNO_3$, MG. = 199·09, l. M. = 29905, 30·14% C, 2·53% H, 35·18% N.

Das Hypoxanthin gibt weder die *Weidel*sche noch die Xanthinprobe.

Stellt man die Reaktionen der einzelnen Basen der Xanthin- (X) und der *Weidel*schen (W) Probe gegenüber zusammen, so erhält man folgendes Bild:

Guanin:	W o . X +
Adenin:	W o . X o
Xanthin:	W + . X +
Hypoxanthin:	W o . X o
Harnsäure:	W + . X +
Cytosin:	W + . X +
Uracil:	W + . X +
Thymin:	W o . X o.

Aber eine Unterscheidung der einzelnen Purinkörper nach diesem Schema und etwa gar nach dem Ausfall der Farbennuancen bei Übersättigung mit Alkali oder NH_3 ist gänzlich problematisch, es wäre am besten, für die beiden Proben die gemeinsame Bezeichnung „Murexidprobe" einzuführen. Siehe dazu auch *E. Fischer.*[1])

Man führt die Probe am besten so aus, daß man wenige Körnchen der zu untersuchenden Substanz mit frisch bereitetem Chlorwasser oder Salzsäure und etwas Kaliumchlorat in einem kleinen Porzellanschälchen bis zum gelinden Sieden über einer kleinen Flamme erwärmt und darin auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Eine zweite Substanzmenge behandelt man in gleicher Weise mit Salpetersäure von 1·12 spez. Gew. Den eventuell gelblich gefärbten Rückstand betupft man mit wenig Ammoniak und erwärmt noch einmal wieder gelinde. In manchen Fällen kommt dann die purpurrote Färbung rascher zum Vorschein. Eine andere Stelle des Rückstandes prüft man mit Natronlauge oder Kalilauge.

5. Cytosin wird identifiziert entweder als Platinchlorhydrat: $(C_4H_5ON_3)_2PtCl_4 2HCl$, MG. = 631·6, l. M. = 80044, C = 15·19%, H = 1·90%, N = 13·31%, Pt = 30·84%, Cl = 33·68%; oder als Pikrat: $C_4H_5ON_3 \cdot C_6H_3O_7N_3$. MG. = 340·12, l. M. = 53163, C = 35·26%, H = 2·37%, N = 24·75%.

Hellgelbe, glänzende Nadeln, die bei 255° sich bräunen und bei 270° (unkorr.) unter Zersetzung schmelzen.

---

[1]) *E. Fischer,* Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2236 (1897).

Das Cytosin gibt die *Weidel*sche Probe.

Das Platindoppelsalz des Cytosins zeigt doppeltbrechende Zwillingsformen, die so aneinander gelagert sind, daß die Auslöschungsrichtung in dem einen Kristall einen Winkel von 53° mit der Auslöschungsrichtung des anderen Kristalls bildet.[1])

6. Thymin: Die Identifizierung des Thymins kann nur durch die Elementaranalyse geschehen. Erleichtert wird die Erkennung der Substanz durch seine Sublimationsfähigkeit und durch den charakteristischen Winkel[2]) seiner Kristalle (60°).

$C_5H_6N_2O_2$, MG. = 126·07, l. M. = 10062, C = 77·60%, H = 4·80%, N = 22·22%.

Löslichkeit in Wasser bei Zimmertemperatur 1:350 H_2O, in heißem Wasser und heißem Alkohol leicht löslich.

7. Das Uracil läßt sich gleichfalls nur durch die Elementaranalyse erkennen.

Es gibt die *Weidel*sche Probe und kristallisiert häufig in kreidig aussehenden Scheiben, die aus konzentrisch angeordneten Nädelchen bestehen.

$C_4H_4O_2N_2$, MG. = 112·05, l. M. = 04940, C = 42·82%, H = 3·59%, N = 25·05%.

8. Die Lävulinsäure kann als Silbersalz bestimmt werden. $C_5H_7O_3Ag$ charakteristischer, kristallinischer Niederschlag, aus Wasser in Blättchen, löslich in 150 Teilen Wasser bei 17° C = 26·91%, H = 3·14%, Ag = 48·43%, oder als Hydrazon durch Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin zur Lösung von Lävulinsäure, $C_{11}H_{14}N_2O_2$, C = 64·07%, H = 6·79%, N = 13·59%, F. P. = 108°.

Die Kristalle zersetzen sich schon beim Aufbewahren im Exsikkator.

9. Epizuckersäure wird als Chininsalz identifiziert. (Bei 90° getrocknet.) $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2C_6H_{10}O_8$, MG. = 858·48, l. M. = 93373, C = 64·28%, H = 6·81%, N = 6·54%.

Lange Nadeln, in kaltem Wasser schwer, in heißem leicht löslich; leicht löslich in Alkohol.

Die Erkennung resp. Identifizierung der echten Nukleinsäure selbst in Gemischen unbekannter Körper ist sehr schwer. Man unterwirft die Flüssigkeiten eventuell dem *Neumann*schen Verfahren und sieht, ob man auf diese Weise einen Niederschlag bekommt. Kriterien der Reinheit der Nukleinsäure sind: Freiheit von jeglicher Eiweißreaktion: nukleinsaures Natron gibt, wie schon S. 575 erwähnt, mit Alkohol allein keinen Niederschlag, sondern erst auf Zusatz weniger Tropfen einer konzentrierten Natriumacetatlösung. Der entstandene Niederschlag muß, eventuell nach Überführung in das Kupfersalz, auf seinen Phosphor- und Stickstoffgehalt quantitativ untersucht werden. Hat man genügend Substanz zur Verfügung,

[1]) *A. Kossel* und *H. Steudel,* Über das Cytosin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 379 (1903).

[2]) *W. Gulewitsch,* Über das Thymin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **27**. S. 292 (1899).

so ist noch eine quantitative Bestimmung der Alloxurbasen (als Nitrate) nach der Salpetersäuremethode anzuschließen.

Pflanzliche Nukleinsäuren.

Von den im Pflanzenreich vorkommenden Nukleinsäuren sind bisher nur die aus Hefe und die aus Weizenembryonen näher untersucht.

Hefenukleinsäure.

An die Isolierung und Erforschung der Hefenukleinsäure hat man sich sehr frühzeitig gemacht; Methoden zu ihrer Darstellung sind von *Altmann* [1]), *Herlant* [2]) und *Slade* [3]) angegeben.

Hier sei die Methode von *Slade* wiedergegeben:

Frische Brauereihefe wird mit 1·1% ihres Gewichts an Ätznatron lebhaft verrührt, in wenig Wasser gelöst und das 2- bis 3fache an kristallisiertem Natriumacetat in Substanz zugesetzt. Gewöhnlich kommen auf 100 Pfd. Hefe 2·8 Pfd. Natriumacetat. Die Lösung bleibt 24 Stunden stehen bei gewöhnlicher Temperatur und wird dann 1 Stunde lang gekocht. Die heiße Lösung wird mit Eisessig bis zur schwach sauren Reaktion neutralisiert und zum erkalteten Filtrat wird Magnesiumsulfat in Substanz (5% der Lösung) und dann Salzsäure unter Umrühren hinzugesetzt, bis ein flockiger Niederschlag entsteht. Der Niederschlag ist im Überschuß der Säure zu einer milchigen Flüssigkeit löslich. Ist dies der Fall, so muß mit Natronlauge wieder neutralisiert und noch einmal gefällt werden. 2·5% starker Salzsäure in der Flüssigkeit genügen im allgemeinen zur vollkommenen Ausfällung. Ausbeute 0·5% der in Angriff genommenen Hefe. Phosphorgehalt des Produktes etwa 7%.

Der Abbau der Hefenukleinsäure und die Darstellung der Spaltungsprodukte erfolgt nach denselben Grundsätzen und Methoden wie bei der tierischen Nukleinsäure, mit der sie vielleicht identisch ist. Ob die Hefenukleinsäure eine Pentosegruppe [4]) und eine reduzierende Hexose [4]) in ihrem Molekül enthält, bedarf weiterer Untersuchung.

Plasminsäure.

Die Isolierung der zuerst von *Kossel* beschriebenen Plasminsäur $C_{15}H_{28}N_6P_6O_{30}$, die aus der Hefe dargestellt werden kann und über deren

[1]) *R. Altmann*, Über Nukleinsäuren. Arch. f. (Anatomie und) Physiologie. 1889. S. 525.

[2]) *L. Herlant*, Untersuchungen über die Nukleinsäure aus unreifer Lachsmilch, aus Kalbsthymus und aus Hefe. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. **44**. S. 157 (1900).

[3]) *H. B. Slade*, Bemerkung zur Darstellung von Nukleinsäure. Am. Journ. of Physiol. Vol. **13**. p. 464 (1905).

[4]) *A. Kossel*, Über die Nukleinsäure. Arch. f. (Anatomie und) Physiologie. 1893. S. 159. — Nach *Levene* und *Jacobs*, Über Hefenukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **42**. S. 2703 (1909) soll die Pentose d-Ribose sein.

genetische Beziehung zur Hefenukleinsäure vorläufig nichts bekannt ist. geschieht am besten nach folgender Methode.[1])

12 *l* untergärige gepreßte Hefe werden in 3 *l* 30%iger Natronlauge gelöst, nach etwa einer Viertelstunde die Lösung mit 2 *l* Wasser verdünnt, mit 2 *l* 48%iger Eisenchloridlösung gefällt und die Masse durch Spitzbeutel filtriert. Das etwa 4—5 *l* betragende braune Filtrat wird in das gleiche Volumen einer Mischung von konzentrierter Salzsäure und 85%igem Alkohol unter Umrühren hineingegossen. Die Salzsäuremenge muß eben ausreichen, um die Flüssigkeit sauer zu machen und wird jedesmal durch Titrierung des alkalischen Filtrates ermittelt. Man läßt den Niederschlag sich absetzen, hebert die darüber stehende Flüssigkeit ab, zentrifugiert den Niederschlag, wäscht und trocknet ihn mit Alkohol und Äther und bringt ihn in das Vakuum. Die Ausbeute an diesem Rohprodukt (A) beträgt 40—80 *g*, sein Phosphorgehalt 5—10%, im Mittel 7%. Es wird mit Wasser extrahiert, darauf filtriert; das gelbe Filtrat von neuem mit Salzsäure und Alkohol, dem etwas Äther zugesetzt wird, gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und ins Vakuum gebracht. Die Ausbeute an diesem zweiten Produkt (B) beträgt 5—10 *g*, sein Phosphorgehalt 13—23%, gewöhnlich 14%. Wird B mit 0·10%iger wässeriger Salzsäure extrahiert, das opalisierende Filtrat durch Alkohol und etwas Äther gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet, so erhält man die Plasminsäure; der in wässeriger Salzsäure ungelöst bleibende Teil, der auch ganz fehlen kann, ist Nukleinsäure. Ausbeute an Plasminsäure 4—5 *g* aus 12 *l* Hefe.

Triticonukleinsäure.

Die Nukleinsäure aus dem Weizenembryo, Triticonukleinsäure, wurde von *Osborne* und *Harris*[2]) dargestellt und untersucht. Auch hier schließen sich die Methoden der Isolierung der Spaltungsprodukte ziemlich an die oben beschriebenen an, so daß von einer ausführlichen Darstellung Abstand genommen werden kann.

Als Spaltungsprodukte der Triticonukleinsäure sind gefunden: Guanin, Adenin, Cytosin, Uracil, Phosphorsäure und eine Pentose; Thymin und ein Hexakohlenhydrat sollen fehlen, auch soll in dieser Nukleinsäure das Uracil nicht aus dem Cytosin durch desamidierende Wirkung der Schwefelsäure sekundär hervorgehen, sondern im Molekül präformiert vorhanden sein. Die Verhältnisse sind aber noch nicht genügend geklärt, so hat z. B. *Osborne* in seinen quantitativen Berechnungen der Spaltungsprodukte der Triticonukleinsäure eine unbekannte Größe x (das damals nicht genügend bekannte Cytosin) eingeführt und damit eine eigentliche quantitative Bestimmung illusorisch gemacht. Die Formel der Triticonukleinsäure wird von *Osborne* und *Harris* zu $C_{41} H_{61} N_{16} P_4 O_{31}$ angegeben. Da bei der Spaltung aus ihr 1 Molekül Guanin und Adenin und 2 Moleküle Uracil hervorgehen sollen, so bleiben, da die Summe der Stickstoffatome dieser Spaltungsprodukte 14 beträgt, für das Cytosin nur noch 2 Stickstoffatome übrig; Cytosin enthält

[1]) *A. Ascoli*, Über die Plasminsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28. S. 426 (1899).

[2]) *Th. B. Osborne* und *J. F. Harris*, Die Nukleinsäure des Weizenembryos. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36. S. 85 (1902).

aber 3 N-Atome. Nach seinen neueren Angaben ist *Osborne*[1]) geneigt, auf 4 Phosphoratome 1 Molekül Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil anzunehmen; dann erhält man als Summe der Stickstoffatome der Spaltungsprodukte 15 und es wäre in seiner Formel ein Stickstoffatom zu viel. Außerdem würde zu einer solchen Annahme nicht die Ausbeute an Uracil stimmen, die *Osborne* und *Harris* früher erhalten haben (11%), denn für 1 Molekül Uracil sind nur 8% berechnet und *Osborne* und *Harris* haben es früher für wahrscheinlicher gehalten, daß sie mit Verlust gearbeitet haben, und geglaubt, ihre Ausbeute von 11% Uracil passe besser zu einem Gehalt von 2 Molekülen Uracil in der Triticonukleinsäure (berechnet 16%).

Eine Berechnung der C-Atome führt ebenfalls zu keinem befriedigenden Ergebnis: Für 1 Molekül Guanin, Adenin, 2 Moleküle Uracil und 3 Moleküle einer Pentose ergeben sich 33 C-Atome; da in der Formel 41 vorhanden sind, blieben für das unbekannte Spaltungsprodukt x 8 übrig. Setzt man für die Formel des Cytosins ($C_4H_5ON_3$) ein, so müßten 2 Moleküle davon in der Triticonukleinsäure vorhanden sein — dazu paßt aber wieder nicht der Stickstoffgehalt. Rechnet man aber als Spaltungsprodukte 1 Molekül Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil, wie dies *Osborne*[1]) und *Heyl* tun (und 3 Moleküle Pentose), so ergeben sich ebenfalls 33 C-Atome und die Schwierigkeit bleibt dieselbe.

Hier müssen also weitere Untersuchungen Klarheit schaffen. Daß ferner das Uracil gerade bei der Triticonukleinsäure nicht von dem primär vorhandenen Cytosin stammen soll, ist nach meinen bisherigen Erfahrungen an der echten Nukleinsäure sehr unwahrscheinlich.

Guanylsäure und Inosinsäure.

Den Nukleinsäuren nahe stehen zwei Substanzen, die ebenfalls substituierte Derivate einer Phosphorsäure sind, die Guanylsäure und die Inosinsäure.

Die Guanylsäure wurde zuerst von *Bang*[2]) aus dem Nukleoproteid des Pankreas dargestellt; sie ist auch in anderen Organen[3]) aufgefunden worden. Das von *Bang* und *Raaschou*[4]) angegebene Verfahren eignet sich nicht zur Gewinnung einer reinen Guanylsäure.

Darstellung des Nukleoproteids aus Pankreas nach *Hammarsten*.[5])

Frische Drüsen, direkt aus dem Schlachthaus bezogen, werden zerkleinert und mit Wasser rasch zum Sieden erhitzt; nach dem Erkalten wird filtriert und aus dem hellbernsteingelben Filtrat das Nukleoproteid durch Zusatz von 5—10‰iger Essigsäure ausgefällt. Die Fällung wird zur Reinigung in Wasser gelöst und noch einmal mit Säure wieder ausgefällt.

---

[1]) *Th. B. Osborne* und *F. W. Heyl*, Die Pyrimidinderivate der Nukleinsäure. Am. Journ. of Physiol. Bd. **21**. S. 157 (1908).

[2]) *J. Bang*, Die Guanylsäure der Pankreasdrüse und deren Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **26**. S. 133 (1898).

[3]) *W. Jones* und *L. G. Rowntree*, On the guanylic acid of the spleen. Journ. of biological chemistry. Bd. **4**. S. 289 (1908). — *P. A. Levene* und *J. Mandel*, Zur Chemie der Lebernukleoproteide. Über die Guanylsäure. Biochem. Zeitschr. Bd. **10**. S. 221 (1908).

[4]) *J. Bang* und *C. A. Raaschou*, Über die Darstellung der Guanylsäure. Beiträge zur chem. Physiol. u. Path. Bd. **4**. S. 175 (1903).

[5]) *O. Hammarsten*, Zur Kenntnis der Nukleoproteide. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **19**. S. 19 (1894).

Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Alkohol und Äther getrocknet. Es resultiert ein feines, staubendes, weißes Pulver: Phosphorgehalt durchschnittlich 4·5% P.[1])

Darstellung der Guanylsäure[2]) aus dem Nukleoproteid.

Portionen von je 12 *g* Proteid werden mit 400 *cm*³ 2%iger Kalilauge versetzt und eine halbe Stunde lang im siedenden Wasserbade gehalten, dann mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert und kochend heiß filtriert. Am nächsten Tage hat sich ein Bodensatz abgeschieden, der filtriert und aus heißem Wasser umgelöst wird. Dann wird der Niederschlag in 1%iger Kalilauge gelöst, vom Ungelösten filtriert und zum Filtrat 5%ige Essigsäure im geringen Überschuß zugesetzt, der Niederschlag filtriert, mit Alkohol gewaschen und mit Äther getrocknet. Ausbeute ca. 10% des Ausgangsmaterials. Phosphorgehalt des Präparates ca. 7·5%, Stickstoffgehalt 18%.[1])

Eigenschaften der Guanylsäure.

Die Guanylsäure ist im Gegensatz zur echten Nukleinsäure in Essigsäure unlöslich, in Salzsäure leicht löslich. Beim längeren Stehen in salzsaurer Lösung wird sie zersetzt. In warmem Wasser ist sie leichter löslich wie in kaltem, sie fällt also beim Abkühlen der Lösung teilweise aus. Löslichkeit in kaltem Wasser 0·3%. Die Alkalisalze sind leicht in Wasser löslich, die Schwermetallsalze in Wasser nicht löslich.

Die Guanylsäure wird nach *Bang* von Gerbsäure und Pikrinsäure, ebenso von Phosphorwolframsäure in saurer Lösung gefällt.

Sie gibt keine *Millon*sche und Biuretreaktion; sie reduziert *Fehling*sche Lösung nicht, wohl aber nach dem vorherigen Kochen mit Salzsäure oder Schwefelsäure und Entfernung des Guanins.

Die Guanylsäure ist rechtsdrehend.

Als Spaltungsprodukt der Guanylsäure bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure hat man als einzigen stickstoffhaltigen Körper Guanin aufgefunden, außerdem entsteht Phosphorsäure und eine Pentose, die nach *Neuberg*[3]) l-Xylose, nach *Levene*[4]) d-Ribose sein soll. Glyzerin ist kein Bestandteil der Guanylsäure.[5])

Die Darstellung der Spaltungsprodukte geschieht am besten nach folgender Vorschrift[5]):

---

[1]) Siehe auch *H. Steudel*, Über die Guanylsäure aus der Pankreasdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **53**. S. 540 (1907).

[2]) *J. Bang*, Die Guanylsäure der Pankreasdrüse und deren Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **26**. S. 133 (1898).

[3]) *C. Neuberg*, Über die Konstitution der Pankreasproteidpentose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. II. S. 1467 (1902).

[4]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über Hefenukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **42**. S. 2703 (1909).

[5]) *H. Steudel*, Über die Guanylsäure aus der Pankreasdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **53**. S. 541 (1907).

10 *g* Guanylsäure werden mit 500 *cm*³ 5%iger Schwefelsäure 3 Stunden lang im siedenden Wasserbad erwärmt. Beim Abkühlen scheidet sich Guaninsulfat in langen Nadeln aus. Die Reaktionsflüssigkeit wird dann einer energischen Ätherextraktion in dem von *Kutscher* und *Steudel* beschriebenen Apparate unterworfen. In das Ätherextrakt geht Furfurol über. Nach der Extraktion mit Äther wird die Zersetzungsflüssigkeit mit Natronlauge genau neutralisiert, worauf sich fast sämtliches Guanin als amorpher, flockiger Niederschlag ausscheidet.

Das Filtrat vom Guanin zeigt starkes Reduktionsvermögen gegen *Fehling*sche Lösung. Aus ihm kann ein Osazon dargestellt oder ein Derivat der Pentose in Form von l-Xylonsäure durch Oxydation mit Brom[1]) gewonnen werden, doch macht die Darstellung Schwierigkeiten.

Die Elementarformel der Guanylsäure (von *Bang*[2]) zu $C_{44}H_{66}N_{20}P_4O_{34}$ angegeben) entspricht nicht den Resultaten meiner Untersuchungen und bedarf einer Richtigstellung.

Die von *Bang*[3]) vorgeschlagene Bezeichnung α- und β-Guanylsäure ist besser fallen zu lassen, die α-Guanylsäure ist nichts anderes wie echte Nukleinsäure, die β-Guanylsäure ist die gewöhnliche Guanylsäure.

Inosinsäure.

Der Guanylsäure ganz analog zusammengesetzt ist die Inosinsäure, sie ist eine Hypoxanthylsäure.

Sie wurde von *Liebig*[4]) im Fleischextrakt aufgefunden, ihr Phosphorgehalt aber erst von *Haiser*[5]) entdeckt.

Die Darstellung der Inosinsäure geschieht am besten nach der von *Haiser* angegebenen Methode:

1 *kg* Fleischextrakt wird am Rückflußkühler mit mehrfach (3—4mal) gewechseltem absoluten Alkohol (je 8 *l*) ausgekocht, bis der Rückstand eine zerreibliche Masse geworden ist. Sie wird in mäßig warmem Wasser (2—3 *l*) gelöst, filtriert und das Filtrat vorsichtig mit Barytwasser ausgefällt, bis sämtliche anorganischen Phosphate niedergeschlagen sind. Da die Inosinsäure ein schwer lösliches basisches Baryumsalz bildet, so liegt die Gefahr nahe, daß in den Barytniederschlag auch die Inosinsäure mit hineingeht. Man prüft also von Zeit zu Zeit während des Barytzusatzes, ob das Filtrat noch eine starke Phosphorsäurereaktion zeigt, und betrachtet in dem Zeit-

---

[1]) *C. Neuberg*, Über die Konstitution der Pankreasproteidpentose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. II. S. 1467 (1902).

[2]) *J. Bang*, Chemische und physiologische Studien über die Guanylsäure. I. Teil. Chemische Studien. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **31**. S. 411 (1901).

[3]) *J. Bang* und *C. A. Raaschou*, Über die Darstellung der Guanylsäure. Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **4**. S. 175 (1903).

[4]) *J. Liebig*, Über die Bestandteile der Flüssigkeit des Fleisches. *Liebigs* Annalen Bd. **62**. S. 317 (1847).

[5]) *F. Haiser*, Zur Kenntnis der Inosinsäure. Sitzungsberichte der kais. Ak. d. Wiss. zu Wien. Mat.-nat. Klasse. Bd. **104**. Abteilung IIb. S. 205 (1895). (Monatshefte für Chemie. Bd. **16**. S. 190.)

punkt die Fällung als beendet, wenn die Reaktion nur noch äußerst schwach auftritt. Der entstandene Niederschlag besteht vorwiegend aus phosphorsaurem und Spuren von schwefelsaurem Baryt. Das Filtrat, welches nun stark alkalisch reagiert, wird mit verdünnter Schwefelsäure genau neutralisiert, und hierauf mit einer konzentrierten Lösung von Silbernitrat so lange versetzt, bis durch weiteren Zusatz desselben die Bildung eines Niederschlages nicht mehr erfolgt. Die Ausscheidung besitzt anfänglich eine gelbbraune Farbe, ist sehr voluminös und verändert beim längeren Stehen, namentlich am Lichte, ihre Farbe. Man filtriert deshalb rasch, wäscht mit kaltem Wasser so lange, bis die Hauptmenge der Lauge entfernt ist, und zersetzt den Niederschlag in der Kälte mit Schwefelwasserstoff. Dabei scheidet sich das Schwefelsilber meist so fein ab, daß eine Abtrennung desselben durch Filtration nicht durchführbar ist. Nach beendeter Zersetzung verdrängt man den Schwefelwasserstoff durch anhaltendes Durchleiten eines Luftstromes, bringt dann die Masse in eine Schale und erwärmt, nachdem man vorher kohlensaures Baryum eingetragen hat.

Daß das Erwärmen erst nach dem Zusatze des letzteren erfolgen darf, kann nicht genug hervorgehoben werden, da Lösungen von freier Inosinsäure sich in der Hitze ziemlich rasch zersetzen. Nach dem Aufkochen zeigt die Flüssigkeit neutrale Reaktion und läßt sich nunmehr in der Regel vom Schwefelsilber und dem Überschuß des Baryumkarbonates filtrieren. Die Lösung wird hernach auf dem Wasserbade, bei etwa 80°, auf ca. 250 *cm*³ eingeengt. Wenn nun die Flüssigkeit einige Zeit gestanden hat, beginnt die Ausscheidung von prächtig glänzenden Blättchen, die vorwiegend aus inosinsaurem Baryt bestehen. Sie werden, wenn sie sich nicht mehr vermehren, was nach ca. 12 Stunden der Fall ist, von der Mutterlauge durch Absaugen getrennt. Diese besitzt meist eine dunkle Farbe und liefert beim weiteren Eindunsten nur höchst unbedeutende Mengen des Salzes. Die abgesaugte Masse löst man in Wasser von 80° und entfärbt mit Tierkohle. Nach dem Filtrieren beginnt bei entsprechender Konzentration der Lösung eine reichliche Ausscheidung vierseitiger Blättchen, die Perlmutterglanz besitzen und die sich so rasch vermehren, daß nach kurzer Zeit das Ganze zu einem Kristallbrei erstarrt. Nach dem Trocknen der von der Mutterlauge getrennten Kristalle hat die Substanz das Aussehen von poliertem Silber, eine Eigentümlichkeit, die auch *Liebig* betont. Ausbeute: Aus 1 *kg* Fleischextrakt 5—7 *g* reines Barytsalz, doch enthält das Fleischextrakt nicht immer diese Mengen Inosinsäure.

Eine andere Methode zur Darstellung der Inosinsäure ist von *Bauer*[1]) angegeben:

500 *g* *Liebig*sches Extrakt werden in 2½ *l* Wasser gelöst, die Lösung mit 40 *g* Tierkohle verrührt und im Brutschrank (bei 37°) unter oftmaligem Umrühren sich selbst überlassen. Dann wird die Flüssigkeit ½ Stunde ang mit der Schüttelmaschine geschüttelt, hernach sofort filtriert. Das

[1]) *Fr. Bauer*, Über die Konstitution der Inosinsäure und die Muskelpentose. Beiträge zur Physiol. u. Pathol. Bd. **10**. S. 345 (1907).

Filtrieren nimmt lange Zeit in Anspruch; es wird dadurch die Lösung von allerhand Verunreinigungen befreit, vor allem von geringen Mengen einer kolloidalen Substanz, die sonst das weitere Arbeiten außerordentlich erschwert. Das Filtrat, eine dunkelrote bis braune Flüssigkeit, die ganz klar sein soll, wird mit Wasser auf 5 *l* verdünnt.

Nun werden die anorganischen Phosphate durch Fällung mit einer 20%igen Lösung von Baryumacetat beseitigt, doch soll ein Überschuß an Acetat vermieden werden. Dann wird von einer kaltgesättigten Lösung von Baryumhydroxyd so lange zugesetzt, bis die vorher saure Reaktion schwach alkalisch zu werden beginnt. Es wird dann filtriert und das Filtrat noch genau auf die Anwesenheit von Phosphorsäure geprüft, doch darf bei den Phosphorproben mit konzentrierter Salpetersäure und molybdänsaurem Ammon nicht zu stark erhitzt werden, da sonst organisch gebundener Phosphor frei wird. Wird noch anorganischer Phosphor nachgewiesen, so muß derselbe durch nochmaligen Zusatz von Baryumacetat und Baryumhydroxyd beseitigt werden.

Die vom Phosphat befreite Lösung gibt nach dem Kochen mit konzentrierter Salpetersäure neuerlich eine starke Phosphorsäurereaktion mit molybdänsaurem Ammoniak durch Abspaltung des organisch gebundenen Phosphors.

Es wird nun eine Lösung von basischem Bleiacetat so lange zugesetzt, bis keine weitere Fällung mehr entsteht, der Niederschlag von der Flüssigkeit durch Filtrieren oder noch besser durch Zentrifugieren getrennt, schließlich auf dem Saugfilter abgesaugt. Der Niederschlag wird einer dreimaligen Waschprozedur unterzogen, deren genaue Ausführung sehr wichtig für die Erzielung einer guten Ausbeute ist. Der Niederschlag wird mit etwa $1^1/_2$ *l* Wasser in der Reibschale sorgfältig verrührt und auf der Nutsche abgesaugt; beim dritten Waschen kann man den Niederschlag nur absaugen, wenn man auf das Nutschfilter eine Schicht fein gepulverten Baryumkarbonats gestreut hat.

Der so mit Baryumkarbonat vermengte Niederschlag wird wieder verrieben, aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat nach Beseitigung des Schwefelwasserstoffs in der Kälte nochmals mit basischem Bleiacetat bis zur vollständigen Ausfällung versetzt. Der Niederschlag wird wieder, wie oben beschrieben, dreimal durch Aufschwemmen gewaschen, wieder mit Schwefelwasserstoff zerlegt, wobei man ein schwach gelb gefärbtes Filtrat erhält. Dieses wird nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs bei niederer Temperatur (etwa 40°) langsam eingedampft. Dazu werden große, etwa 4—5 *l* fassende Schalen mit flachem Boden benutzt, die am besten in einen großen Brutraum, der 40° hält, hineingestellt werden. Es treten allmählich am Boden Kriställchen auf, die zum Teil kugelige Drusen bilden. Ist der Schaleninhalt bis auf etwa 30 cm^3 eingedampft, so wird die ganze Masse in ein Spitzglas gebracht, nach dem Absetzen der Kristalle der überstehende Sirup abgegossen und die zarte Kristallmasse durch mehrmaliges Aufschwemmen mit ganz wenig Wasser

von den Resten des Sirups annähernd befreit: sie stellt dann eine lachsrote Masse dar, die durch Umkristallisieren aus heißem Wasser von der rot gefärbten Substanz befreit wird und dann millimeterlange schöne Nädelchen bildet, die durch nochmaliges Umkristallisieren schneeweiß erhalten werden. Ausbeute: 3 *g* Barytsalz aus 1 *kg* Fleischextrakt.

Haiser hat neuerdings eine andere Methode zur Darstellung der Inosinsäure angegeben:

Das Extrakt wird in etwa 5 Teilen warmen Wassers von ungefähr 40° gelöst und Barythydrat zugesetzt, bis kein Niederschlag erfolgt. Man scheue sich nicht davor, daß im Filtrate Baryt erscheint, sondern setze so lange Baryt zu, als im Filtrate noch ein Niederschlag entsteht. Es wird hierbei aus so verdünnter Lösung weder Inosinsäure noch Karnin gefällt, was bei Inosinsäure wenigstens in konzentrierterer Lösung der Fall wäre.[1]) Nach dem Absaugen des Barytniederschlages, der übrigens nach dem Auswaschen mit heißem Wasser nur Spuren von organischen Substanzen enthält, wird die starke alkalische Flüssigkeit mit Essigsäure neutralisiert. Sodann wird in der Kälte mit Bleiessig ausgefällt, indem man so lange davon zusetzt, bis eben kein Niederschlag mehr entsteht. Ein Überschuß ist zu vermeiden, da dieser lösend auf den Niederschlag wirkt. Aus dem mit kaltem Wasser gut ausgewaschenen Niederschlage gewinnt man nach Zerlegung mit Schwefelwasserstoff in der Kälte, Aufkochen mit Baryumkarbonat und Einkochen des Filtrates im Vakuum den inosinsauren Baryt, und zwar 5—6 *g* aus einem Pfund Fleischextrakt. Die Ausbeute hängt ganz von der Frische desselben ab; aus alten dunkelbraunen Sorten wurde oft nicht die Spur gewonnen, aus ganz frischen hellgelben dagegen 7 *g*.

Das Filtrat von der Bleiessigfällung wird mit Ammoniak versetzt, wobei abermals ein Bleiniederschlag entsteht, der das Karnin enthält. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Dies kann in der Hitze vorgenommen werden, geschieht jedoch zweckmäßiger auch in der Kälte, damit etwa entstandene freie Säuren keine Zersetzung hervorrufen. Noch vor dem Abfiltrieren des Bleisulfides werden die Säuren mit Baryumkarbonat neutralisiert, hierauf wird filtriert und zum Sirup eingedampft. Nach dem Impfen mit Karninkristallen oder nach 24stündigem Stehen kommt die ganze Masse zur Kristallisation. Die Kristalle werden abgesaugt, kalt gewaschen und dreibis viermal unter Eindampfen mit wenig Tierkohle aus Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt ebenfalls 5—6 *g* pro Pfund frischen Fleischextraktes.

Dieses Karnin ist entgegen der bisherigen Ansicht nicht einheitlich, sondern ein Gemenge aus Hypoxanthin und einem Derivat der Inosinsäure, dem Inosin. Das Inosin ist derjenige Teil des Inosinsäuremoleküls, der nach Abspaltung der Phosphorsäure übrig bleibt, und besteht aus Hypoxanthin und einer Pentose, MG. = 268.

---

[1]) *F. Haiser* und *F. Wenzel*, Über Karnin und Inosinsäure (I. Mitteilung). Monatshefte für Chemie. Bd. **29**. Heft II. S. 157 (1908).

Inosin (feine, seidenglänzende Nadeln):

$C_{10}H_{12}N_4O_5$: 44·77% C, 4·47% H, 20·89% N.

F.P. = 215° unscharf unter Zersetzung.

Löslichkeit in Wasser bei 20° 1·615 *g* Inosin in 100 *cm*³ Wasser. Zum Umkristallisieren dient am besten 80%iger Alkohol.

Spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -49·2°$.

Die bei der hydrolytischen Spaltung erhaltene Pentose liefert ein Osazon vom Schmelzpunkt 163°.

Eigenschaften der Inosinsäure.

Die **freie Inosinsäure** $C_{10}H_{13}N_4PO_8$ kristallisiert nicht und zersetzt sich leicht.

Das **Baryumsalz** $C_{10}H_{11}N_4PBaO_8$ kristallisiert mit 7½ Mol. Kristallwasser, von denen 6½ Mol. bei 100—105° entweichen; das letzte Molekül entweicht erst bei 100° im Vakuum.

Für $C_{10}H_{11}N_4OBaO_8 + H_2O$ bei 100—105° getrocknet, berechnet sich C 23·95%, H 2·59%, N 11·17%, P 6·18%, Ba 27·34%.

Das lufttrockene Salz gibt bei 100—105° 6½ Mol. Kristallwasser ab = 19·17% H_2O.

Das **Calciumsalz** kristallisiert in farblosen, durchsichtigen, monoklinen Prismen, die in kaltem Wasser schwer, in heißem leicht löslich sind. Das Salz enthält Kristallwasser, das bei 100—105° bis auf ein Molekül entweicht.

$C_{10}H_{11}N_4CaPO_8 + H_2O$ verlangt 9·51% Ca und 7·73% P.

Das **Kali-** und **Ammoniumsalz** sind äußerst hygroskopische Körper, die nur schwierig kristallisieren, das **Kupfersalz** ist in Wasser unlöslich, in Ammoniak löslich; das **Silbersalz** fällt in einer neutralen Lösung als gelatinöser weißer Niederschlag, löslich in Salpetersäure und in Ammoniak.

Die Inosinsäure reduziert nicht *Fehling*sche Lösung, wohl aber nach dem Sieden mit Mineralsäuren und nach Entfernung des Hypoxanthins, sie gibt intensive Pentosenreaktion mit Orcin und Phloroglucin, sie ist linksdrehend $[\alpha]_D = -18·5°$.

Bei der Hydrolyse mit verdünnter Mineralsäure zerfällt die Inosinsäure in Hypoxanthin, Phosphorsäure und eine Pentose:

$$C_{10}H_{13}N_4O_8P + 2H_2O = H_3PO_4 + C_5H_{10}O_5 + C_5H_4N_4O.$$

Über die Natur der Pentose herrscht noch keine Übereinstimmung. *Neuberg* und *Brahn*[1]) geben an, aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit ein linksdrehendes Osazon erhalten zu haben vom Schmelzpunkt 159 bis 160°; danach wäre die Pentose eine l-Xylose. *Bauer*[2]) erhielt ebenfalls ein Osazon vom Schmelzpunkt 158—159°, „konnte sich aber nicht von

[1]) *C. Neuberg* und *B. Brahn*, Über die Inosinsäure. Biochemische Zeitschrift. Bd. 5. S. 449 (1907).

[2]) *Fr. Bauer*, Über die Konstitution der Inosinsäure und die Muskelpentose. Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **10**. S. 356 (1907).

seiner optischen Aktivität überzeugen und hält die Pentose für d-l-Arabinose. Ihm bleibt es auffällig, daß die bei der Hydrolyse der Inosinsäure erhaltenen Lösungen niemals Rechtsdrehung zeigen, was doch bei Auftreten von freier l-Xylose zu erwarten wäre. *Neuberg*[1]) und *Brahn* erklären dieses Verhalten durch unvollständige Zerlegung der linksdrehenden Inosinsäure einerseits, durch partielle Zerstörung der rechtsdrehenden Pentose andrerseits. Doch war in *Bauers*[2]) Versuchen die Inaktivität auch nach Verschwinden der organisch gebundenen Phosphorsäure, also nach totaler Zerlegung der Inosinsäure, vorhanden, obgleich die Lösung reichlich Pentose enthielt. Dieser Punkt bedarf somit noch der Aufklärung."

Nach den Untersuchungen von *Haiser* und *Wenzel*[1]), die sowohl das Inosin (den Hypoxanthin und die Pentose enthaltenden Komplex) wie die Pentosephosphorsäure, die bei der Spaltung der Inosinsäure entsteht, einer gründlichen Untersuchung unterwarfen, kann es sich bei der Pentose vielleicht um d-Lyxose handeln. *Levene* und *Jacobs*[2]), die die Untersuchungen von *Haiser* und *Wenzel* aufgenommen haben, glauben dagegen d-Ribose vor sich zu haben.

---

[1]) *F. Haiser* und *F. Wenzel*, Über Karnin und Inosinsäure. Sitzung d. Akad. d. Wiss. zu Wien vom 10. Dezember 1908. Monatshefte für Chemie. Bd. **30**. S. 147 (1909).

[2]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über Inosinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **42**. S. 1198 (1909). — Dieselben, Über Hefenukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **42**. S. 2703 (1909).

b) Partielle Hydrolyse der Nukleinsäuren.

Von **P. A. Levene**, New-York.

Die totale Hydrolyse der Nukleinsäuren hat die Natur der einzelnen Komponenten und in gewissen Grenzen auch die Mengenverhältnisse, in denen die einzelnen Bausteine vorhanden sind, aufgeklärt. Die partielle Hydrolyse ermöglicht eine Vorstellung über die Art der Bindung der einzelnen Bestandteile. Die bisherigen Resultate führen zu der Ansicht, daß unter den in der Natur vorkommenden Nukleinsäuren zwei Formen zu unterscheiden sind. Die eine Gruppe (Inosinsäure, Guanylsäure) besteht aus Phosphorsäure, einem Kohlehydrat und aus Basen. Der Einfachheit halber seien solche Komplexe Nukleotide genannt.

Die komplizierteren Nukleinsäuren (Zoo- und Phytonukleinsäuren) sind aus mehreren derartigen Nukleotiden zusammengesetzt. Bei der Spaltung dieser Nukleinsäuren — Polynukleotide — sind Substanzen von der Zusammensetzung der Mononukleotide gewonnen worden.

Aus den Nukleotiden erhält man je nach der Art der Hydrolyse zweierlei Komplexe: Einmal solche, die nur aus Phosphorsäure und dem Kohlehydrat zusammengesetzt sind, und ferner solche, welche außer dem Basenanteil auch das Kohlehydrat enthalten. Für den letzteren Komplex ist der Gruppennamen Nukleoside vorgeschlagen worden.

Von den nach der Theorie möglichen Nukleosiden sind bis jetzt drei durch Abbau von Nukleinsäuren in reinem, kristallinischem Zustande isoliert worden, nämlich das Inosin, das Guanosin und das Adenosin.

Aus der Gruppe der Kohlehydratphosphorsäuren ist bis jetzt nur eine erhalten worden, die d-Ribosephosphorsäure (aus der Inosinsäure), und zwar in Form eines schön kristallinischen Baryumsalzes.

Von den Nukleotiden kommen zwei, wie schon erwähnt, in der Natur vor (die Inosinsäure und die Guanylsäure). Durch partielle Hydrolyse ist ferner aus der Thymonukleinsäure die Thymo-glyko-phosphorsäure in verhältnismäßig reinem Zustande erhalten worden.

I. Nukleoside.

1. Inosin, $C_{10}H_{12}N_4O_5$, ist von *Haiser* und *Wenzel*[1]) im Fleischextrakte entdeckt und von *Levene* und *Jacobs*[2]) bei der Spaltung der Inosinsäure erhalten worden. Um die Substanz in guter Ausbeute zu gewinnen, muß man

[1]) *F. Haiser* und *F. Wenzel*, Über Carnin und Inosinsäure. Monatshefte f. Chemie. Bd. 29. S. 157 (1908).

[2]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über Inosinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 42. S. 335 und 1198 (1909).

die Hydrolyse bei möglichst neutraler Reaktion ausführen. Bei saurer Reaktion wird ein Teil der Nukleinsäure vollständig zersetzt. Gegen Alkalien ist sie, wie die anderen Nukleinsäuren, sehr resistent. 50 *g* ihres Baryumsalzes werden in 200 *cm*³ Wasser aufgenommen und im zugeschmolzenen Rohre 4 Stunden auf 135° erhitzt. Die vom Baryumphosphat befreite Lösung wird hierauf bis auf 300 *cm*³ eingeengt und die noch nicht zerlegte Inosinsäure, nach dem Verfahren von *Haiser* und *Wenzel*, mit Bleiessiglösung gefällt. Zum Filtrate von diesem Niederschlag werden dann abwechselnd wässerige Ammoniaklösung und Bleizuckerlösung zugegeben, und zwar solange, als dabei sich noch ein Niederschlag bildet. Dieser Niederschlag wird dann in heißem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Bleisulfid wird nun unter vermindertem Druck und bei einer Temperatur von etwa 45° eingedampft. Beim Abkühlen scheiden sich lange, tyrosinähnliche Kristalle des Inosins ab. An der Luft getrocknet enthält die Substanz 2 Moleküle Kristallwasser. Schon beim Trocknen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure wird das Wasser abgegeben. Die lufttrockene Substanz sintert bei 85° und schmilzt bei 89—90°. Der wasserfreie Körper zersetzt sich unter Verkohlen bei 215°. Das Drehungsvermögen der wässerigen Lösung ist $[\alpha]\frac{20^0}{D} = -49{\cdot}2^0$.

Spaltung des Inosins und Gewinnung der kristallinischen d-Ribose. 5 *g* Inosin werden in 500 *cm*³ $\frac{n}{10}$-Schwefelsäure aufgelöst und 1 Stunde am Rückflußkühler erhitzt. Zu der Lösung wird ein kleiner Überschuß an Silbersulfat zugefügt und das Reaktionsgemisch über Nacht stehen gelassen. Vom Silberpurin wird abfiltriert und im Filtrat das gelöste Silber durch Schwefelwasserstoff und die Schwefelsäure mit Baryumkarbonat entfernt. Es ist wichtig, um die Pentose kristallinisch zu erhalten, jede Verunreinigung fern zu halten. Schon eine kleine Beimischung von Mineralsalzen hindert oft das Kristallisieren vollständig. Man benutzt deswegen zum Entfernen der Schwefelsäure Baryumkarbonat, welches aus umkristallisiertem Baryumhydrat frisch bereitet worden ist. Das Filtrat vom Baryumsulfat wird unter vermindertem Druck zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit absolutem Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung wird im Vakuumexsikkator langsam eingedunstet und der Rückstand, wenn möglich, mit einem Kriställchen von d-Ribose geimpft. Der Sirup erstarrt in ganz kurzer Zeit zu einer kristallinischen Masse. Die Substanz kann dann aus heißem absolutem Alkohol umkristallisiert werden. Schmelzpunkt = 87°. Das Drehungsvermögen beträgt $[\alpha]\frac{20^0}{D} = -19{\cdot}2^0$.

2. Guanosin, $C_{10}H_{13}N_5O_5$ [3]), wurde bei der partiellen Spaltung von Guanylsäure und von Hefenukleinsäure erhalten. Das Verfahren zur Gewinnung des Guanosins war bei beiden Nukleinsäuren ein ähnliches.

Da zur Darstellung des Guanosins größere Mengen von Guanylsäure nötig sind, sei hier ein von *Levene* und *Jacobs* [1]) ausgearbeitetes Verfahren zur direkten Gewinnung

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über Guanylsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 42. S. 2469 (1909) und Über die Hefe-Nukleinsäure. Ebenda. Jg. 42. S. 2474 (1909).

dieser Säure aus der Pankreasdrüse angegeben. Die Drüsen werden zerhackt, mit Wasser aufgekocht und in die Mischung Kaliumacetat bis zu einem Gehalt von 5% eingebracht. Zu der noch warmen Lösung wird eine konzentrierte Lösung von Kalilauge bis zu einem Gehalt von 5% des Alkalis zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht stehen gelassen. Es wird dann das Eiweiß mittelst Pikrinsäure und Essigsäure entfernt. Das eiweißfreie Filtrat enthält dann die Thymonukleinsäure und die Guanylsäure. Um diese zu trennen, wird in das Filtrat eine 25%ige Bleizuckerlösung eingetragen, solange sich ein Niederschlag bildet. Dieser besteht aus dem Bleisalz der Thymonukleinsäure. Aus dessen Filtrat fällt bei Zugabe von wässerigem Ammoniak ein zweiter Niederschlag. Er enthält das Bleisalz der Guanylsäure. Dieses Salz wird in heißem Wasser aufgenommen. Der Kolben mit der Suspension wird nun in ein kochendes Wasserbad eingestellt und dann Schwefelwasserstoff durch die Aufschwemmung durchgeleitet. Die vom Bleisulfid abfiltrierte Lösung wird bei vermindertem Druck und etwa 60° bis zum dicken Sirup eingedampft und dann im Kälteraum bei 1° C stehen gelassen. Die rohe Guanylsäure scheidet sich dabei in gelatinöser Form aus. Zur weiteren Reinigung kann man die Substanz in heißem Wasser lösen und mit Alkohol fällen. Dieser Niederschlag ist biuretfrei und kann direkt zur Darstellung des Guanosins benützt werden. Man erhält aber das kristallinische Guanosin leichter, wenn man von gereinigten Präparaten ausgeht. Zu diesem Zweck wird der mit Alkohol erzeugte Niederschlag mehreremal in heißem Wasser gelöst und durch Abkühlung niedergeschlagen.

Zur Darstellung des Guanosins aus Guanylsäure wird diese in einem kleinen Überschuß von Kaliumhydrat gelöst (etwa 3 *g* der Substanz in 100 cm^3 Lösung) und mit Essigsäure genau neutralisiert. Nun wird im eingeschlossenen Rohre 4 Stunden auf 135° erhitzt. Ist die angewandte Guanylsäure rein gewesen, dann scheidet sich beim Abkühlen der Lösung das Guanosin in Form einer Gallerte aus, welche mikroskopisch ein filzförmiges Aussehen besitzt. Beim Umkristallisieren dieser Substanz bekommt man dann das reine Guanosin. Wird aber die Hydrolyse mit der Rohsubstanz ausgeführt, dann bleibt die Gallerte auch nach mehrfachem Umfällen amorph und in diesem Falle tut man besser, die Gallerte in heißem Wasser aufzulösen und mit Bleiessig, wie es beim Inosin beschrieben ist, zu reinigen.

Auch das Guanosin kristallisiert in langen tyrosinähnlichen Kristallen. An der Luft getrocknet enthält es zwei Moleküle Kristallwasser. Schmelzpunkt = 237° (unter Verkohlen). Das Drehungsvermögen beträgt (in $\frac{n}{10}$-Natronlauge gelöst) $[\alpha]_D^{20^0} = -60{\cdot}52^0$.

Zur Gewinnung der d-Ribose aus Guanosin wird geradeso verfahren, wie es beim Inosin beschrieben worden ist.

3. Adenosin, $C_{10}H_{13}N_5O_4$, und dessen Trennung von Guanosin. Das Adenosin ist bis jetzt nur aus Hefenukleinsäure gewonnen worden.

Da es für die Gewinnung des Nukleosids wichtig ist, die angewandte Nukleinsäure in möglichst reinem Zustande zu haben, so sei hier das von *Levene* und *Jacobs* angewandte Verfahren zur Darstellung der Hefenukleinsäure angegeben.[1]) Käufliche Substanz wird in möglichst wenig heißem Wasser aufgelöst, die Lösung mittelst einer Saugepumpe abfiltriert und das Filtrat dann mit einem großen Überschuß an Eisessig gefällt. Die Fällung wird über Seide abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Die auf diese Weise dargestellte Substanz eignet sich gut zur Gewinnung der Nukleoside.

[1]) *P. A. Levene,* Über die Hefenukleinsäure. Biochem. Zeitschr. Bd. **17**. S. 120 (1909). *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs,* l. c., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **42**. S. 2474 u. 2703 (1909).

Zur Gewinnung des Adenosins werden etwa 35·0 *g* der Nukleinsäure in Wasser, unter Zuhilfenahme von Kalilauge, aufgelöst. Die Lösung wird auf Lackmus genau neutralisiert und auf ein Volumen von 1 *l* gebracht. 15·0 *g* Kaliacetat werden nun in die Lösung eingetragen und diese dann 8 Stunden im Autoklaven bei einer Temperatur von 180—190° des Ölbades erhitzt. Nach dem Abkühlen des Autoklaven wird das Reaktionsprodukt in eine Kältemischung eingestellt. Nach einigem Stehen scheidet sich das Guanosin fast quantitativ aus. Dieses Guanosin enthält noch kleine Verunreinigungen, welche das Kristallisieren des Nukleosids bis zu einem gewissen Grade hindern. Will man die kristallinische Substanz ohne Zeitverlust erhalten, so macht man auch hier Gebrauch vom Bleiverfahren. Das Filtrat vom Guanosin wird zur Darstellung der anderen Nukleoside benutzt. Zu diesem Zwecke wird die Lösung mit einer 25%igen Lösung von Bleizucker behandelt, solange sich ein Niederschlag bildet. In das Filtrat werden dann vorsichtig und abwechselnd wässeriges Ammoniak und Bleizuckerlösung eingetragen. (Das Verfahren unterscheidet sich von dem von *Haiser* und *Wenzel* angegebenen nur dadurch, daß Bleizucker an Stelle von Bleiessig gebraucht wird). Der entstehende Niederschlag wird auf die übliche Weise von Blei befreit und die Lösung dann unter vermindertem Druck bis zu einem ganz kleinen Volumen (etwa 20 cm^3) eingedampft. Jetzt wird sie im Kälteraum über Nacht stehen gelassen. War nicht alles Guanosin bei der ersten Fällung abgeschieden worden, so fällt es bei dieser Operation aus. Nunmehr werden 3 *g* Pikrinsäure in möglichst wenig heißem Wasser gelöst und in die guanosinfreie Lösung eingetragen. Bei langsamer Abkühlung scheidet sich das Pikrat des Adenosins kristallinisch aus. Bei rascherem Abkühlen fällt es amorph. Will man das Adenosin ganz aschefrei erhalten, so ist es vorteilhaft, das Pikrat aus Wasser umzukristallisieren. Das Pikrat sintert bei 180° und schmilzt bei 185° (korr.). Zur Darstellung des freien Nukleosids wird das Pikrat in heißem Wasser gelöst und die Lösung nach dem Abkühlen mit verdünnter Schwefelsäure bis zur saueren Reaktion auf Kongo angesäuert. Die Pikrinsäure wird dann mit Äther ausgeschüttelt. Die wässerige Lösung wird darauf mit frisch bereitetem Baryumkarbonat von Schwefelsäure befreit und unter vermindertem Druck bis auf ein ganz kleines Volumen (etwa 10—15 cm^3) eingedampft. Beim Stehen im Kälteraume bei etwa + 1° scheidet sich das Adenosin in tyrosinartigen Kristallen aus. An der Luft getrocknet, kristallisiert die Substanz mit 1·5 Molekülen Kristallwasser. Schmelzpunkt der trockenen Substanz = 229° (korr.) bei raschem Erhitzen. Das Drehungsvermögen beträgt: $[\alpha]_D^{20°} = -67·30°$.

II. d-Ribose-phosphorsäure, $C_5H_{11}O_8P$[1]).

Diese Verbindung ist in Form des Baryumsalzes, $C_5H_9O_8PBa + 5H_2O$, bei der Spaltung der Inosinsäure erhalten worden. 10·0 *g* des inosinsauren

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über die Inosinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 41. S. 2703 (1908).

Baryumsalzes werden in 200 cm^3 5%igen Schwefelsäure aufgelöst und in einem Wasserbade bei 50° solange erhitzt, bis die ursprünglich linksdrehende Lösung eine konstante Rechtsdrehung erreicht hat. Dazu sind etwa 12 Stunden erforderlich. Das Reaktionsgemisch wird dann von Hypoxanthin mit Silbersulfat, dann von Silber mit Schwefelwasserstoff und von Schwefelsäure mittelst frisch bereiteten, chemisch reinen Baryumkarbonates befreit. Das Filtrat vom Baryumsulfat und Baryumkarbonat wird unter vermindertem Druck und etwa 35° bis auf ein kleines Volumen eingedampft. Beim Abkühlen scheidet sich das Baryumsalz der noch unzersetzt gebliebenen Inosinsäure aus. Dieses wird abfiltriert. Die Mutterlauge wird im Exsikkator über Schwefelsäure aufbewahrt und im Kälteraum bei + 1° stehen gelassen. Nach einigen Wochen scheidet sich das kristallinische Baryumsalz aus.

An der Luft getrocknet enthält die Substanz 5 Moleküle Kristallwasser. Die Substanz reduziert *Fehling*sche Lösung. Bei weiterer Hydrolyse wird sie in die Pentose und in Phosphorsäure zerlegt.

III. Thymo-hexose-phosphorsäure, $C_{11} H_{17} N_2 P O_{10}$.[1])

Diese Verbindung ist bisher noch nicht in kristallinischer Form erhalten worden. Das liegt wahrscheinlich an der noch nicht völligen Reinheit der gewonnenen Produkte. 80·0 g der Thymonukleinsäure, aus der Milz dargestellt, werden in 1500 cm^3 $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure 4 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird dann filtriert und im Filtrate ein Überschuß von Silbersulfat aufgelöst. Es scheiden sich dabei beim 24stündigen Stehen die Silberpurine vollständig aus. Das Filtrat von diesem Niederschlage wird mit Barytwasser neutralisiert. Dabei bildet sich ein zweiter Niederschlag. Dieser wird von Silber mittelst Schwefelwasserstoffs und von überschüssigem Baryt mittelst Kohlensäure befreit. Das schließlich erhaltene Filtrat wird dann unter vermindertem Druck bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit Alkohol gefällt. Nach längerem Aufbewahren unter Alkohol geht ein Teil der Substanz in eine unlösliche Form über. In dieser Hinsicht verhält sie sich ähnlich den Baryumsalzen anderer gepaarter Phosphorsäureverbindungen. Diese Substanzen besitzen alle die Eigenschaft, beim Kochen ihrer Lösung oder beim Aufbewahren in Alkohol in eine unlösliche Form überzugehen. Das unlösliche Baryumsalz besitzt die Zusammensetzung des Salzes der Thymo-glyko-phosphorsäure. Beim Spalten mittelst 25%igen Schwefelsäure lassen sich aus der Substanz Thymin und Lävulinsäure gewinnen. Das Filtrat von dem unlöslichen Salze kann wieder mit Alkohol gefällt werden. Durch mehrmaliges Umfällen erhält man auch auf diese Weise ein Baryumsalz von der Zusammensetzung des Salzes der Thymo-glyko-phosphorsäure.

---

[1]) *P. A. Levene* und *J. A. Mandel*, Über die Konstitution der Thymonukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **41**. S. 1905 (1908). — *Carl Luca Alsberg*, Nukleinsäure. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **51**. S. 240 (1904).

c) Isolierung von Purinbasen oder Alloxurkörpern aus Pflanzen.

Von **E. Winterstein**, Zürich.

Die spezifischen Purinbasen des Pflanzenreiches sind das Theïn oder Koffeïn, das Theobromin und das Theophyllin; außerdem findet man in den meisten Pflanzen kleinere Mengen Xanthin, Hypoxanthin, Adenin und Guanin. In welchen Mengen Xanthin und Hypoxanthin primär in pflanzlichen Organen vorkommen, läßt sich nicht mit Bestimmtheit angeben, da bei der Isolierung die Purinkörper Veränderungen erleiden können. So fand *Krüger*[1]), daß die Teelauge höchstens Spuren von Hypoxanthin enthält, und er führt den von anderen Forschern gefundenen hohen Hypoxanthingehalt auf eine Umwandlung des Adenins durch die frei werdende salpetrige Säure zurück. Die Purinbasen finden sich zum Teil frei, zum Teil bilden sie in Verbindung mit Phosphorsäure, Eiweiß und anderen Komplexen die Nukleïnstoffe. Auch glykosidähnliche Stoffe dieser Basen sind bekannt, so z. B. das Vernin, welches bei der Spaltung mit Säuren Guanin und eine Zuckerart liefert.

Die Purinbasen sind fällbar durch Phosphorwolframsäure, durch Merkurinitrat, durch Silbernitrat, bei Anwesenheit von Salpetersäure, und ferner werden sie beim Kochen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt. Um eine Trennung der einzelnen Purinbasen herbeizuführen, benützt man das Verhalten der Silberdoppelverbindungen.

Nach *E. Schulze* und *E. Boßhard* verfährt man behufs Isolierung der Purinbasen wie folgt:

Die pflanzlichen Objekte werden mit heißem Wasser oder stark verdünntem Alkohol extrahiert; um eine möglichst vollständige Extraktion zu erzielen, kann man etwas verdünnte Mineralsäure zusetzen. Die Extrakte werden mit Bleiessig vollständig ausgefällt, wobei man einen Überschuß tunlichst vermeidet. Die von der Bleifällung getrennte Flüssigkeit wird mit Merkurinitrat ausgefällt. Die durch dieses Reagens hervorgebrachten weißen Niederschläge werden aufs Filter gebracht und mit kaltem Wasser ausgewaschen, sodann mit Wasser zu einem dünnen Brei verrührt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die konzentrierten und von Schwefelwasser-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **21**, S. 275 (1896).

stoff befreiten Lösungen fällt man sodann mit ammoniakalischem Silbernitrat aus.

Man kann aber auch die Fällbarkeit der Alloxurbasen durch Phosphorwolframsäure benutzen. Zu diesem Zwecke reinigt man die Pflanzenextrakte mit Bleiessig, fällt das Blei mit Schwefelsäure aus und fügt zu der vom Bleisulfat getrennten Flüssigkeit konzentrierte Phosphorwolframsäurelösung hinzu, bis keine Fällung mehr auftritt. Der Niederschlag wird nach 24stündigem Stehen auf die Nutsche gebracht, mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen. Man zersetzt die Fällung mit einem Überschuß von Baryt, saugt die Lösung ab und entfernt den überschüssigen Baryt mit Kohlensäure; die vom Baryumkarbonat getrennte Lösung neutralisiert man nahezu mit Salpetersäure, dunstet auf dem Wasserbade ein und fällt aus der konzentrierten Lösung mit Silbernitrat aus. Ob hierbei, ohne Zusatz von Ammoniak, die Alloxurbasen quantitativ gefällt werden, ist nicht bekannt.

Ob man, wie beim Teextrakt, die Alloxurbasen direkt mit Silbernitrat und Ammoniak ausfällen kann, ist nicht untersucht worden. Doch dürfte dieses Verfahren wohl öfters auf Schwierigkeiten stoßen, da Pflanzenextrakte gewöhnlich Stoffe enthalten, welche Silbernitrat reduzieren.

Nach *M. Krüger*[1]) verfährt man in folgender Weise:

Verdünnte Teelauge wird mit verdünnter Schwefelsäure von den Huminsubstanzen befreit. Das Filtrat wird mit Natronlauge nahezu neutralisiert, die Flüssigkeit zum Sieden erhitzt und die Basen durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit als Kupferoxydulverbindung ausgefällt. Es bilden sich braune Flocken, welche sich allmählich absetzen. Dieser Niederschlag wird in heißem Wasser mit farblosem Natriumsulfid in geringem Überschuß zersetzt. Das Filtrat wird eventuell nochmals in der angegebenen Weise mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt. Der nun erhaltene Niederschlag wird gut ausgewaschen. Dieser Niederschlag enthält die Alloxurbasen außer Koffeïn und Theobromin. Über die Trennung der im Niederschlag enthaltenen Basen siehe weiter unten.

Das Koffeïn, $C_8H_{10}N_4O_2 + H_2O$, bildet feine, seidenglänzende Nadeln; es sublimiert ohne Zersetzung und schmilzt bei 235°. Es wird durch Phosphorwolframsäure gefällt, nicht durch ammoniakalische Silberlösung und Kupferoxydul. Koffeïn ist leicht löslich in heißem Chloroform. Behufs Identifizierung bestimmt man den Schmelzpunkt und führt die Murexidprobe aus.

Aus Kaffee kann die Base wie folgt dargestellt werden: die gemahlenen Bohnen werden mit Wasser dreimal ausgekocht, die Extrakte mit Bleiessig, unter Vermeidung eines Überschusses, ausgefällt, das vom Bleiniederschlag getrennte Filtrat mit Hilfe von Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und die vom Bleisulfid getrennte Lösung unter Zusatz von reiner Magnesia und etwas Sand zur Trockne eingedunstet, der Trockenrückstand im Soxhlet mit Chloroform extrahiert. Nach dem Verdampfen des Chloro-

[1]) *M. Krüger*, Die Gewinnung des Adenins aus Teeextrakt. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21. S. 278 (1896).

forms bleibt das Koffeïn in nahezu reinem Zustand zurück. Man reinigt es durch Umkristallisieren aus Chloroform, Wasser oder Alkohol. Nach diesem Verfahren läßt sich das Koffeïn nahezu quantitativ abscheiden. Oder man bereitet sich einen Teig aus 5 Teilen gemahlenem Kaffee und 1 Teil Magnesia, trocknet, pulverisiert das Gemisch und extrahiert mit Chloroform.

Für die quantitative Bestimmung des Koffeïns sind verschiedene Methoden vorgeschlagen worden, auch das obige Verfahren von *A. Hilger* und *E. Fricke*[1]) gibt befriedigende Resultate. Nach Angaben mehrerer Autoren soll das von *Katz* angegebene Verfahren die besten Resultate liefern. Das *Katz-Beitter*sche[2]) Verfahren wird wie folgt ausgeführt:

Man schüttelt 10 *g* des Drogenpulvers 30 Minuten lang mit 200 *g* Chloroform und 5 *g* Ammoniak, filtriert die Lösung ab, dunstet 150 *g* des erhaltenen Filtrates ab, löst den Rückstand in etwa 5 cm^3 Äther, fügt 20 cm^3 0·5%iger Salzsäure hinzu, verdunstet den Äther auf dem Wasserbade, filtriert die Lösung nach dem Erkalten ab, wäscht das Filter mit 0·5%iger Salzsäure aus; die vereinigten Lösungen werden 2 Stunden im Extraktionsapparat mit Chloroform ausgezogen. Die Chloroformlösung wird abgedunstet, der Rückstand wird gewogen.

Auch aus Teeblättern kann das Koffeïn nach den beschriebenen Methoden gewonnen werden.

Theobromin, $C_7 H_8 N_4 O_2$, bildet mikroskopische, bitterschmeckende Kristalle des rhombischen Systems; es sublimiert ohne zu schmelzen bei 290—295°. In siedendem Chloroform ist es viel schwerer löslich als Koffeïn; es ist unlöslich in Tetrachlorkohlenstoff wie auch in Benzol und kann durch diese Lösungsmittel vom Koffeïn getrennt werden. Es wird durch Phosphorwolframsäure gefällt, nicht durch ammoniakalische Silberlösung und auch nicht durch Kupferoxydul (Kupfersulfat und Natriumbisulfit).

Das Theobromin wird am besten aus entfetteten Kakaobohnen nach dem beim Koffeïn angegebenen Verfahren gewonnen. Nach *Decker*[3]) empfiehlt es sich, die gepulverten Bohnen mit der halben Menge Magnesia und der dreißigfachen Menge Wasser eine Stunde am Rückflußkühler zu kochen, dann zu filtrieren, einzudunsten und den Rückstand mit Chloroform auszukochen. Man trennt das in Lösung gegangene Koffeïn mit Hilfe von Tetrachlorkohlenstoff.

Das Theophyllin, $C_7 H_8 N_4 O_2 + H_2 O$, bildet deutliche, makroskopisch sichtbare, dünne Tafeln des monosymmetrischen Systems. Es schmilzt bei 264°; es ist löslich in heißem Wasser. Es wird durch ammoniakalisches Silbernitrat gefällt. Es gibt die sogenannte *Weidel*sche Reaktion. Dampft man die Lösung mit Chlor- oder Bromwasser zur Trockne ein, so hinterbleibt ein scharlachroter Rückstand, der sich mit Ammoniak violett färbt

[1]) Archiv der Pharm. Jg. 1885. S. 827.

[2]) Ber. d. pharm. Gesellsch. Bd. 12. S. 250 (1902). — *A. Beitter*, ibid. Bd. 12. S. 339.

[3]) Rec. trav. chim. P. B. T. 22. p. 142 (1903).

und durch überschüssige Natronlauge entfärbt wird. Das gleiche Verhalten zeigt auch Theobromin.

Darstellung des Theophyllins. Der mit Wasser verdünnte Teextrakt wird zunächst durch Zusatz von Schwefelsäure von einer harzigen Substanz befreit. Die davon getrennte Flüssigkeit wird mit Ammoniak stark alkalisch gemacht und sodann mit ammoniakalischem Silbernitrat gefällt. Der dabei entstandene Niederschlag wird nach vierundzwanzig Stunden von der Flüssigkeit getrennt, sodann mit warmer Salpetersäure digeriert.[1]) Beim Erkalten scheiden sich Silberdoppelverbindungen des Adenins und Hypoxanthins aus. Sie werden durch Filtration getrennt, das Filtrat mit Ammoniak übersättigt; es scheidet sich alsbald ein aus Xanthin- und Theophyllinsilber bestehender Niederschlag aus. Dieser Niederschlag wird nach einigem Stehen abfiltriert, ausgewaschen und nach dem Ansäuern mit Salpetersäure, mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Beim Eindampfen scheiden sich zuerst kleine Mengen von Xanthin aus, nach weiterem Konzentrieren scheidet sich das Theophyllin in Nadeln oder rhombischen Kristallen aus. Man kann auch die Fällbarkeit des Theophyllins durch Mercurinitrat bei Gegenwart von Natriumkarbonat zu dessen Darstellung aus konzentrierten Lösungen benutzen.

Trennung der Alloxurbasen. Die von *M. Krüger* und *G. Salomon*[2]) angegebene Trennungsmethode der Alloxurkörper des Harns dürfte sich auch für die Trennung der in den Pflanzen vorhandenen Purinbasen eignen. Sie sei daher hier kurz erwähnt. Sind die Alloxurbasen durch ammoniakalische Silberlösung gefällt worden, so wird der gewaschene Niederschlag in einem im siedenden Wasserbade befindlichen Rundkolben durch verdünnte Salzsäure zersetzt, bis die voluminöse Silberverbindung verschwunden ist; dann erhitzt man auf freier Flamme, gibt die gleiche Menge der vorher verbrauchten Salzsäure hinzu, filtriert heiß und wäscht den Niederschlag mit stark verdünnter Salzsäure aus.

Hat man die Alloxurbasen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt, so wird der mit heißem Wasser gewaschene Niederschlag ebenfalls im Rundkolben mit Wasser erwärmt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, dann mit Salzsäure schwach angesäuert, Schwefelwasserstoff eingeleitet und die Lösung heiß filtriert.

Das salzsaure Filtrat wird durch wenig Tierkohle entfärbt. Die Lösung wird nun auf dem Wasserbade bei gelinder Temperatur eingedunstet. Man befördert das Eindunsten durch Darüberleiten eines kräftigen Luftstromes. Um die Salzsäure möglichst zu entfernen, dunstet man noch 2mal mit Wasser und zuletzt unter Zusatz von Alkohol ein. Der Verdampfungsrückstand wird sodann mit Wasser bei 40° digeriert, nach mehrstündigem

[1]) Dabei können einige Alloxurkörper infolge Bildung von freier salpetriger Säure Veränderung erleiden. *M. Krüger*, Die Gewinnung des Adenins aus Teeextrakt. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **21**. S. 275 (1896).

[2]) *M. Krüger* und *G. Salomon*, Die Alloxurbasen des Harns. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **26**. S. 373 (1898).

Stehen abfiltriert, mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther getrocknet. Aus den Filtraten kann man durch nochmaliges Konzentrieren eine kleine Menge Basen erhalten, welche mit den ersten vereinigt werden. Der ungelöste Teil enthält das Xanthin und Heteroxanthin, in die wässerige Lösung gehen über: Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin.

Trennung der ersten Fraktion, der sogenannten Xanthinfraktion: Das Gemenge der Basen wird in der fünfzehnfachen Menge 3·3%iger, salzsäurefreier Natronlauge heiß gelöst. Innerhalb 24 Stunden scheidet sich das Natriumsalz des Heteroxanthins in reinem Zustand fast vollständig aus. Je 60 cm^3 des auf 60° erwärmten Filtrates werden in ein kaltes Gemisch von 20 cm^3 konzentrierter Salpetersäure und 20 cm^3 Wasser langsam unter Umrühren eingetragen; innerhalb mehrerer Stunden scheidet sich beim Stehen in der Kälte salpetersaures Xanthin aus. Um es zu reinigen, löst man in wenig Natronlauge und fällt wieder bei 60° mit Salpetersäure aus. Zur Darstellung des freien Xanthins wird die ammoniakalische Lösung des Nitrats eingedampft, wobei sich die Base in amorphen Krusten abscheidet.

Trennung der zweiten, der Hypoxanthinfraktion. Die salzsaure, vom Xanthin und Heteroxanthin getrennte Lösung wird mit Ammoniak in geringem Überschuß versetzt, wobei Epiguanin sich in kleinen glänzenden Prismen ausscheidet. Das Filtrat wird durch Erhitzen vom Ammoniak befreit und die nicht zu konzentrierte Lösung in der Kälte vorsichtig mit 1·1%iger Pikrinsäurelösung in geringem Überschuß versetzt und das ausgeschiedene Adeninpikrat sofort abgesogen. Man versetzt das Filtrat mit Schwefelsäure und schüttelt die Pikrinsäure mit Benzol aus, nun fällt man die noch vorhandenen Basen durch ammoniakalische Silberlösung oder durch Kupfersulfat und Bisulfit wieder aus, zersetzt die Fällung mit Schwefelwasserstoff und dampft ein. Man löst den trockenen Rückstand in der dreiunddreißigfachen Menge heißer verdünnter Salpetersäure (90 cm^3 Wasser und 10 cm^3 konzentrierter Salpetersäure). Beim Erkalten scheidet sich Hypoxanthinnitrat in reinem Zustand aus.

Das Filtrat enthält noch etwas Hypoxanthin, Heteroxanthin und das Paraxanthin; um letzteres zu isolieren, fällt man nochmals als Silber- oder Kupferoxydulverbindung, aus der Fällung werden die Basen, wie angegeben, isoliert. Man dampft die salzsaure Lösung ein und behandelt den Rückstand mit wenig Wasser, dabei geht das Paraxanthin nebst dem Hypoxanthin in Lösung. (Man fällt eventuell nochmals als Silber- oder Kupferoxydulverbindung.) Sodann kristallisiert man das Gemisch der beiden Basen aus verdünnter Salpetersäure um und scheidet aus der Mutterlauge vom Hypoxanthin das Paraxanthin als Natriumsalz in der Kälte aus.

Ist Guanidin vorhanden, so geht dieses in beide Fraktionen. Um es aus der Xanthinfraktion zu erhalten, wird diese mit Ammoniak behandelt, wobei Guanidin ungelöst bleibt. In der Hypoxanthinfraktion findet es sich neben dem Epiguanin und kann von letzterem durch Behandeln mit heißem Wasser oder heißem verdünnten Ammoniak getrennt werden.

Das Adenin gewinnt man am besten aus Teextrakt durch Fällen mit ammoniakalischem Silbernitrat oder Kupferoxydul, wie oben Seite 613 angegeben ist. Man zersetzt den voluminösen Niederschlag unter Erwärmen mit verdünnter Salzsäure, entfärbt das Filtrat mit Tierkohle und dampft zur Trockne ein. Der Rückstand wird dann unter Zusatz von wenig Salzsäure in Wasser gelöst, die Lösung mit Ammoniak oder Ammonkarbonat schwach alkalisch gemacht und 24 Stunden stehen gelassen; es scheidet sich Adenin aus, welches auf dem Filter mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen wird. Um es aus der Kupferoxydulfällung darzustellen, zersetzt man diese mit farblosem Schwefelammon und verdampft zur Trockne. Der Rückstand wird unter Zusatz von Ammonkarbonat mit Wasser aufgekocht; nach 24 Stunden hat sich das Adenin ausgeschieden. Das Rohprodukt kann durch Überführen in das Sulfat, welches wohlausgebildete ckarakteristische Kristalle bildet, gereinigt werden.

Das Allantoin, $C_4H_6N_4O_3$, kristallisiert in kleinen seidenglänzenden Prismen, welche sich sehr schwer in kaltem, leichter in kochendem Wasser lösen. Es wird durch Silbernitrat auf Zusatz von Ammoniak und auch durch Mercurinitrat gefällt. Beim Kochen mit Natronlauge entsteht Ammoniak und Oxalsäure.

Darstellung.[1] Die mit Hilfe von Wasser oder verdünntem Alkohol erhaltenen Pflanzenextrakte reinigt man mit Bleiessig und fällt die vom Bleiniederschlag getrennte Flüssigkeit mit Mercurinitrat aus. Der gut ausgewaschene Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber getrennte Flüssigkeit wird mit Ammoniak neutralisiert und die neutrale Lösung bei gelinder Wärme eingedunstet. Die Lösung enthält das Allantoin neben dem Asparagin. Um beide Körper voneinander zu trennen, sättigt man diese Lösung in der Hitze mit Kupferhydroxyd und läßt erkalten, wobei sich das Asparagin als Kupfersalz ausscheidet; man filtriert davon ab und befreit das Filtrat mit Hilfe von Schwefelwasserstoff vom Kupfer, dunstet die Lösung ein; das Allantoin kristallisiert alsbald aus. Zuweilen kann auch Allantoin zusammen mit Asparagin auskristallisieren, man trennt dann beide durch Umkristallisieren. Das Asparagin ist leichter löslich als das Allantoin.

Das Vernin. Diese von *E. Schulze* und *E. Boßhard*[2]) aufgefundene Substanz kann man als ein Glykosid der Purinreihe bezeichnen, da es bei der Spaltung mit Säuren Guanin und eine Glukose[3]) liefert.

Das Vernin, $C_{10}H_{13}N_5O_5$, bildet feine, atlasglänzende, lange, äußerst dünne Prismen. Das Vernin scheidet sich aus konzentrierten Lösungen äußerst schnell aus.

---

[1]) *E. Schulze* und *E. Boßhard*, Zur Kenntnis des Vorkommens von Allantoin, Asparagin etc. in den Pflanzen. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **9**. S. 430 (1885).

[2]) Über einen neuen stickstoffhaltigen Pflanzenbestandteil. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **10**. S. 80 (1886).

[3]) Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **41**. S. 457 (1909).

Es ist schwer löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser, unlöslich in Alkohol, löslich in Ammoniak und in Salzsäure. In der wässerigen Lösung des Vernins erzeugt Silbernitrat eine gallertartige, durchsichtige Fällung, welche in Ammoniak löslich ist. Mit Mercurinitrat entsteht ein weißer flockiger Niederschlag. Phosphorwolframsäure in saurer Lösung gibt einen gelblichen Niederschlag. Es gibt die Murexidreaktion.

Darstellung: Die getrockneten und zerriebenen Pflanzen werden mit Wasser extrahiert, die Extrakte mit Bleiessig gereinigt, die vom Bleiniederschlag getrennte Lösung mit Mercurinitrat ausgefällt. Der dadurch hervorgebrachte Niederschlag wird mit kaltem Wasser ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber getrennte Lösung wird mit Ammoniak neutralisiert und vorsichtig konzentriert. Nach dem Erkalten scheidet sich zuweilen eine Gallerte aus, welche kleinere Mengen von Asparaginkristallen einschließt. Die Ausscheidung wird auf einem Filter gesammelt, mit kaltem Wasser oder verdünntem Weingeist ausgewaschen. Um die beigemengten Asparaginkristalle abzutrennen, kristallisiert man das Rohprodukt aus Wasser um, wobei das Vernin, infolge der schweren Löslichkeit, sich zuerst ausscheidet. Eventuell kann man die Fällbarkeit des Vernins durch Silbernitrat zur Trennung vom Asparagin benutzen. Sind dem Vernin Alloxurbasen beigemengt, so können diese durch Ausfällen mit Silbernitrat und Ammoniak entfernt werden, da die Silberverbindung des Vernins in Ammoniak löslich ist.

Das Hämatin und seine Abbauprodukte.

Von **William Küster**, Stuttgart.

Die eisenhaltige Komponente des Hämoglobins, dem Gewicht nach etwa 4% des großen Moleküls ausmachend, wird aus diesem bei der Einwirkung von Säuren abgespalten und gewöhnlich in Form eines chlorhaltigen Kunstproduktes, des sogenannten Hämins, gewonnen, entweder dadurch, daß das Globin, der Eiweißkörper des Blutfarbstoffes, in lösliche Substanzen übergeführt wird, während das Hämin zurückbleibt, oder dadurch, daß der eisenhaltige Anteil herausgelöst und vom Globin durch Filtration getrennt wird. Wir bedienen uns also recht eingreifender Mittel zur Darstellung des gesuchten Körpers, und dem ist es wohl zuzuschreiben, daß bereits das erste hier zu beschreibende Produkt, das Hämin, gegenüber der eisenhaltigen Komponente der lebenden roten Blutkörperchen, chemische Verschiedenheiten aufweist. Diese von *Hoppe-Seyler*[1]) Hämochromogen genannte Substanz vermag ja unter anderem Sauerstoff und andere Gase zu absorbieren[2]), welche Eigenschaft dem Hämin nicht zukommt.

I. Darstellung von Rohhämin.

Zur Darstellung von rohem Hämin dienen die Methoden von *Mörner*[3]) und von *Schalfejeff*[4]). Die erstere ist dann zu empfehlen, wenn im längere Zeit fortzusetzenden Betriebe große Mengen von Blut verarbeitet werden sollen, die Methode *Schalfejeffs* zeichnet sich dadurch aus, daß sie nur wenige, immer vorhandene Apparate erfordert.

---

[1]) *F. Hoppe-Seyler*, Beiträge zur Kenntnis des Blutes des Menschen und der Wirbeltiere. Med.-chem. Unters. Heft 4. S. 544 (1871). — Derselbe, Beiträge zur Kenntnis der Eigenschaften der Blutfarbstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **13**. S. 477 (1889).

[2]) *G. v. Hüfner* und *W. Küster*, Einige Versuche, das Verhältnis der Gewichte zu bestimmen, in welchem sich das Hämochromogen mit Kohlenoxyd verbindet. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. Sppl. 1904. S. 387.

[3]) *K. A. H. Mörner*, Zur Darstellung und Zusammensetzung der Häminkristalle. Nordiskt Med. Arch. Festband Nr. I. Nr. 26. S. 1 (1896). — *W. Küster*, Über die Hämatine verschiedener Darstellungs- und Blutarten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 187. Anm. (1900).

[4]) *M. Schalfejeff*, Über die Darstellung des Hämins. Le Physiologiste russe. T. 1. p. 15. Moscou (1898); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**c. S. 232.

A. Die *Mörner*sche Methode gestattet bei kleinem Laboratoriumsbetrieb die tägliche Verarbeitung von 15 *l* defibrinierten Blutes, sie kann auch auf Blutkörperchen und auf kristallisiertes Hämoglobin angewendet werden.

Man bringt in einem Kupferkessel von zirka 25 *l* Inhalt ein Gemisch von 5 *l* Ochsenblut und 15 *l* Wasser nach Zusatz 50 cm^3 1%iger Schwefelsäure durch Holzfeuerung unter stetem Umrühren bis zum lebhaften Aufwallen und überträgt das erhaltene Koagulum in Drillsäcke von 50 *cm* Länge und 35 *cm* Durchmesser, die fest aufgespannt worden sind. Sobald die Flüssigkeit abgelaufen ist, folgt ein Abpressen (hierzu eignet sich eine große Fruchtpresse von 45 *cm* Durchmesser), worauf der Preßkuchen in einer Alexanderwerk-Reibemaschine gemahlen und das Pulver mit 2—3 *l* 90%igem Alkohol angerieben wird. Jetzt wird ein zweitesmal abgepreßt, der Preßkuchen gewogen und wiederum in der Maschine zerkleinert, was jetzt mühelos geht. Das Pulver wird nun auf 5 Porzellanschalen verteilt, in jede derselben werden etwa 500 *g* kommen, da das Gewicht des Kuchens zwischen 2·2—2·8 *kg* schwanken wird (der Feuchtigkeitsgehalt beträgt etwa 50%) und jede mit 1750 cm^3 90%igen Alkohols beschickt; dazu kommen dann unter Umrühren je 40 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure, mit welchem Gemisch nunmehr die Masse zwei Stunden in einem kühlen Raum digeriert wird.

Inzwischen sind 5 Trichter von zirka 35 *cm* Durchmesser, in die man zweckmäßig kleinere von 12 *cm* Durchmesser einsetzt, mit entsprechenden Filtern (es eignet sich z. B. Nr. 281 von *Dreverhoff*) beschickt worden, in welche die Masse nun gebracht wird. Sobald die dunkelrote Flüssigkeit völlig abgetropft ist, werden die Filter samt ihrem Inhalt wieder in einen Drillsack (von gleichen Dimensionen wie oben angegeben) gebracht und in der gereinigten Presse vollständig ausgepreßt. Die Filtrate und Preßsäfte werden gemessen, in einer Ballonflasche miteinander gemischt und die 1 *l* Blut entsprechende Menge des alkoholischen Extrakts in einem im Wasserbade liegenden Rundkolben gerade bis zum Sieden gebracht, worauf ein Gemisch von 8 cm^3 25%iger Salzsäure und 12 cm^3 90%igen Alkohols unter Umschütteln zugefügt wird. Hierbei tritt starkes Aufschäumen ein, man wähle also den Rundkolben entsprechend groß. Jetzt wird die Flüssigkeit sofort in ein Becherglas abgegossen und der Inhalt durch Einstellen in kaltes Wasser tüchtig gekühlt, worauf man zwei Tage ruhig stehen läßt, damit sich das Hämin möglichst vollständig zu Boden setzt, so daß der überstehende Alkohol klar abgegossen werden kann. Der Bodensatz wird dann auf ein Filter gebracht, nach Ablauf der immer noch weinrot gefärbten Mutterlauge mit zirka 50%igem Alkohol, der 1% Salzsäure enthält, nachgewaschen und die Kristallmasse schließlich auf Fließpapier zunächst an der Luft, dann bei mäßiger Wärme (70°) getrocknet.

Die Ausbeute wechselt, im Durchschnitt beträgt sie 3·5 *g* Hämin pro Liter Blut, sie dürfte sich nach dem verschiedenen Gehalt des verwendeten Blutes an Hämoglobin richten, ist also um so besser, je kräftiger

die Tiere waren, deren Blut zur Verarbeitung kam. Daher kommt es denn auch, daß die Ausbeuten bei Verwendung von Rinderblut gewöhnlich diejenigen übertreffen, die man aus Pferdeblut erzielt. In diesem Falle tut man übrigens gut, nur den nach 24 Stunden abgesetzten Blutkörperchenbrei zur Herstellung des Hämins zu benutzen, da man hierdurch erheblich an Alkohol sparen kann, die leichte Fäulnis des Blutes aber für die Methode *Mörners* nicht von Belang ist. Man erhält dann nämlich im Durchschnitt pro Liter Blutkörperchen 520 *g* Blutkuchen, verwendet zu dessen Extraktion zweckmäßig 2 *l* 90%igen Alkohols und erhält — wieder im Durchschnitt — 4·8 *g* Hämin.[1])

Natürlich kann man, falls eine Zentrifuge zur Verfügung steht, auch Rinderblutkörperchen verwenden, doch ist diese Modifikation, welche allerdings ein sehr reines Hämin liefert, so langwierig, daß größere Mengen von Hämin im Laboratorium kaum herstellbar sind.

Anmerkung. Der vom ausgeschiedenen Hämin abgegossene Alkohol wird über Kalk abdestilliert, wonach er gewöhnlich 85%ig (volumprozentig) ist; er kann von neuem für das Verfahren mit stärkerem Alkohol zu 90% gemischt verwendet werden.

B. Die Methode von *Schalfejeff*, in der Modifikation von *Nencki-Zaleski*[2]), ist nur auf frisches Blut anwendbar, d. h. das Blut eines am Vormittage geschlachteten Tieres muß spätestens am Nachmittage verarbeitet werden, auch ist es zweckmäßig, immer nur kleine Portionen auf einmal in Arbeit zu nehmen, die am besten in einem offenen Raum auszuführen ist. Man erwärme in einem Rundkolben von 2 *l* Inhalt 1 *l* mit Kochsalz gesättigtem Eisessig von 99—100% im Wasserbade auf 90°, trage unter beständigem Umschütteln höchstens $^1/_4$ *l* defibrinierten Blutes in dünnem Strahle ein und erwärme wieder auf 90°. Sobald der ganze Inhalt des Kolbens von den atlasglänzenden Häminkristallen erfüllt erscheint, gieße man durch ein Koliertuch in eine große Porzellanschale und lasse dann über Nacht stehen. Nun wird die stark gefärbte Flüssigkeit von dem am Boden sitzenden Hämin abgegossen und das letztere mit 1%iger Salzsäure auf Filter gespritzt, nach dem Auswaschen wird es auf Fließpapier getrocknet. Ausbeute bis 5·5 *g* pro Liter Blut.

II. Darstellung von Dehydrochlorid-Hämin und von reinem Hämin.

Das nach den soeben beschriebenen Methoden hergestellte Rohhämin enthält gewöhnlich noch Beimengungen, sehr häufig z. B. Eiweiß. Zur Reinigung kann man sich einer direkten Umscheidung bedienen oder man

---

[1]) *W. Küster*, Über die nach verschiedenen Methoden hergestellten Hämine, das Dehydrochloridhämin und das Hämatin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **40**. S. 402 (1904).

[2]) *M. Nencki* und *J. Zaleski*, Untersuchungen über den Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 390 (1900).

stellt sich zunächst einmal das um die Elemente des Chlorwasserstoffs ärmere Dehydrochloridhämin[1]) her.

A. Höchstens 5 *g* Rohhämin (je größere Mengen angewendet werden, um so schwerer gelingt es, alles Chlor zu entfernen) werden in einer Schale mit frisch destilliertem Anilin angerieben und die Masse mit Anilin in eine weithalsige Flasche übergespült, so daß dessen Menge etwa 110 *g* beträgt. Dann schüttelt man auf der Maschine 2 Stunden lang, filtriert und wäscht mit ein wenig Anilin nach. Auf dem Filter bleiben die Verunreinigungen zurück, deren Menge nach Entfernung des anhängenden Anilins durch eine Extraktion mit Äther bestimmt werden kann. Das Filtrat wird in ganz dünnem Strahle in 2 *l* 20%iger Essigsäure, welche durch einen Rührer in Bewegung erhalten wird, eingetragen, wobei sich das Dehydrochloridhämin zunächst in Gestalt von harzigen Klumpen absetzt, die aber bald bröcklig werden. Nach eintägigem Stehen gießt man die Flüssigkeit durch ein Filter ab und bringt den Farbstoff, den man zum Teil von den Wänden des Becherglases loskratzen muß, in eine Schale, reibt die Stücke von neuem mit 20%iger Essigsäure an, sammelt die Masse schließlich auf dem Filter und wäscht mit Essigsäure aus, bis das Ablaufende Anilinreaktionen nicht mehr gibt. Das zunächst auf Fließpapier, dann im Vakuum getrocknete Präparat wird nun 2—3 Tage im *Soxhlet*schen Apparat mit Äther extrahiert, bis der Rückstand (dieser enthält auch in Äther schwer lösliche Teile, darunter einen aus siedendem Alkohol in rotgelben Nadeln kristallisierenden Körper, der ein eisenfreies Derivat des Hämins vorstellt, das sich unter dem Einfluß des Anilins gebildet hat[2]), welchen der Äther immer, wenn auch in geringer Menge, hinterläßt, an verdünnte Essigsäure Anilin nicht mehr abgibt. Das alsdann getrocknete Dehydrochloridhämin hat die Zusammensetzung $C_{34}H_{31}O_4N_4Fe$ resp. $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$, vgl. die Notiz bei *C*, es stellt eine fast schwarze, amorphe Masse dar, die sich leicht in jedem Alkali, ferner auch in Eisessig auflöst, schwer löslich ist in Äther und Chloroform, nicht löslich ist in Alkohol oder Aceton, auch nicht in verdünnten Säuren. Beim Zusammenreiben mit konzentrierter Schwefelsäure wird der größte Teil des Eisens aus dem Präparat entfernt, ohne daß Lösung eintritt; gießt man dann die Masse in viel kaltes Wasser, so nimmt dieses gar keinen oder nur sehr geringe Mengen von Farbstoff (Hämatoporphyrin) auf; es verhält sich damit das Dehydrochloridhämin wie das Hämatin, während sich Hämin in konzentrierter Schwefelsäure auflöst.

B. Zur Darstellung von reinem Hämin nimmt man ebenfalls am besten nur geringe Mengen, höchstens 5 *g* frisch gewonnenes Dehydrochloridhämin oder Rohhämin in Arbeit. Zunächst wird zur Lösung des Farbstoffs je 1 *g* desselben mit 1 *g* Chinin und 25 cm^3 Chloroform etwa

---

[1]) *W. Küster,* Über die nach verschiedenen Methoden hergestellten Hämine, das Dehydrochloridhämin und das Hämatin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **40**. S. 408/11 (1904).

[2]) *W. Küster* und *K. Fuchs,* Über ein neues kristallisiertes Derivat des Hämins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **40**. S. 2021 (1907).

5 Minuten lang geschüttelt, dann durch ein Kreppfilter von *Dreverhoff* filtriert und mit Chloroform nachgewaschen.

Das erhaltene Filtrat wird in je 150 *cm*³ mit Kochsalz gesättigten Eisessigs, der während des Lösens des Farbstoffs auf 105—110° erhitzt worden ist, unter beständigem Rühren eingetragen, wobei das Chloroform teilweise verdampft. Noch während des Erkaltens erscheinen dann die ersten Häminkristalle, zur Vollendung der Ausscheidung läßt man aber mindestens einen Tag bei kühler Außentemperatur stehen, filtriert dann und wäscht die Mutterlauge (sie kann nach Vertreibung des Chloroforms noch ein zweites Mal zur Umscheidung von Rohhämin benutzt werden, die in ihr gelöst bleibenden Anteile des Farbstoffs lassen sich wenigstens teilweise wiedergewinnen) mit verdünnter Essigsäure, die etwas Salzsäure enthält, aus; die Kristalle werden erst auf Fließpapier, dann im Vakuum neben Kaliumhydroxyd getrocknet.

Statt Chinin kann auch Pyridin verwendet werden, von dem aber auf 1 *g* Farbstoff erst etwa 7·5 *cm*³ ausreichen, auch muß dann die Chloroformmenge auf ca. 40 *cm*³ vermehrt werden und zum Eisessig setze man kurz vor dem Eintragen der Farbstofflösung ¹/₂—1 *cm*³ konzentrierter Salzsäure. Ausbeute: 0·6—0·8 *g*.

C. Zusammensetzung: $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$. Das Molekulargewicht ist nicht ermittelt; bei Annahme von zweiwertigem Eisen müßten 33 H-Atome vorhanden sein.

Das Hämin bildet dünne Blätter und Säulchen des triklinischen Systems; die größten von ihnen sind 0·2 *mm* lang und 0·05 *mm* breit, der Habitus der Kristalle und ihrer sternähnlichen Durchkreuzungsviellinge erinnert an die Gipsgestalten. Im auffallenden Lichte erscheinen sie schwach metallisch glänzend, im durchgehenden Lichte dunkelbraun und wenig durchsichtig.

Im Kapillarröhrchen erhitzt, sintert das Hämin gegen 240° und schmilzt selbst bei 300° nicht.

Das Hämin besitzt saure Eigenschaften, löst sich demnach in verdünnten Alkalien, auch in Karbonaten und organischen Basen auf, es enthält zwei durch Metalle noch vertretbare Wasserstoffatome, auch zur Bildung von Estern oder Äthern ist das Hämin befähigt.[1]) Mit verdünnten Säuren bildet es keine Salze, löst sich also auch in ihnen nicht, durch konzentrierte Schwefelsäure wird es unter Entwicklung von Chlorwasserstoff gelöst, wobei auch Hämatoporphyrinbildung eintritt und das Eisen zum größten Teil herausgelöst wird.

Von organischen Solventien löst nur 70—80⁰/₀iger Alkohol, aber auch nur sehr schwer, reichlichere Lösung tritt auf Zusatz von Schwefelsäure ein.

---

[1]) *M. Nencki* und *J. Zaleski,* Untersuchungen über den Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 390 (1900).

III. Darstellung von Hämatin.

Wird Hämin in einem Alkali gelöst, so tritt außer der Salzbildung auch ein Ersatz des Chlors, das wahrscheinlich mit dem Eisen verbunden ist, durch Hydroxyl ein. Und während dann die löslichen Alkalisalze durch Säuren wieder zerlegt werden, ist es nicht ohne weiteres möglich, das herausgelöste Chlor wiederum an Stelle des Hydroxyls einzuführen. Der Grund für dieses Verhalten ist noch nicht aufgefunden worden, wir müssen an eine unter dem Einfluß des Alkalis eintretende Polymerisation der Molekel oder an eine intramolekulare Verschiebung von Atomgruppen denken, die um so rascher sich vollzieht, je stärker das Alkali ist. Jedenfalls erhält man auf Zusatz von Säuren, auch von Salzsäure, zu einer Lösung des Hämins in z. B. Natronlauge nicht Hämin zurück, sondern einen chlorfreien Körper von ganz anderen Eigenschaften, den man den Namen „Hämatin" gegeben hat. Zur Darstellung von „Hämatin" werden z. B. 5 *g* reines Hämin mit ein wenig Alkohol in einer Schale angerieben und mit einer Auflösung von 1 *g* NaOH in 500 cm^3 eiskaltem Wasser in eine Flasche übergespült, in der dann die vollständige Lösung des Farbstoffs durch kurzes Schütteln erreicht wird. Man filtriert dann durch ein Kreppfilter in einen hohen Literzylinder, wäscht mit kaltem Wasser nach, fügt 100 cm^3 einer 1 volumprozentigen Schwefelsäure hinzu, schüttelt um, läßt das gefällte Hämatin absitzen und dekantiert zweimal mit kaltem Wasser. Nun wird nochmals in reiner Natronlauge gelöst — es genügen jetzt 0·67 *g* NaOH — und wieder mit Schwefelsäure gefällt. Es geschieht dies, da durch einmalige Behandlung mit dem Alkali eine vollständige Herausnahme des Chlors nicht erreicht wird. Der am besten abermals durch öfteres Dekantieren gereinigte, sehr voluminöse Hämatinschlamm wird schließlich auf ein gehärtetes Filter (Dreverhoff Nr. 495) gebracht und mit kaltem Wasser SO_4-frei gewaschen, dann abgesaugt, zunächst auf Fließpapier, dann im Vakuum oder bei gelinder Wärme getrocknet.

Die Zusammensetzung des Hämatins läßt sich durch die Formel $C_{34}H_{33}O_5N_4Fe$ wiedergeben, es ist amorph, dürfte also aus einem Gemenge bestehen, das dunkel stahlblaue, metallisch glänzende Stücke bildet, die sich zu einem fast schwarzen, spezifisch schweren Pulver zerreiben lassen. Des Verhaltens des Hämatins gegen konzentrierte Schwefelsäure ist bereits beim Dehydrochloridhämin gedacht worden. In jedem Alkali löst sich Hämatin auf, eine sehr verdünnte Lösung in Natronlauge zeigt im Spektrum ein breites, mattes Band, zwischen C und D. Setzt man zu einer ammoniakalischen Lösung des Hämatins ein Reduktionsmittel, z. B. Kaliumsulfhydrat oder am besten eine Hydrazinlösung, so färbt sich die Lösung purpurrot. Sie enthält nunmehr das sogenannte Hämochromogen[1]), dessen Spektrum zwei Bänder zwischen D und E zeigt. Der erste Streifen ist dunkler und scharf begrenzt.

[1]) *R. v. Zeynek*, Über das Hämochromogen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25. S. 492 (1898).

IV. Darstellung von Hämatoporphyrin.

Während konzentrierte Schwefelsäure Hämin nur zum kleinsten Teil in einem eisenfreien Farbstoff verwandelt, von *Hoppe-Seyler* Hämatoporphyrin genannt[1]), der neben den sauren noch basische Eigenschaften besitzt und mit Säuren wasserlösliche Salze bildet, deren Lösungen stark gefärbt sind, gelingt die Darstellung eines solchen, von *Nencki* ebenfalls Hämatoporphyrin genannten Körpers leicht unter dem Einfluß von Bromwasserstoff.[2]) Bemerkenswert ist, daß Hämatin bei der gleichen Behandlung ein Produkt liefert, das mit Halogenwasserstoffsäure kein lösliches Salz gibt, während Dehydrochloridhämin sich dem Hämin an die Seite stellt. Zur Darstellung des Hämatoporphyrins beschickt man eine Anzahl von Kölbchen zu je 300 cm^3 Inhalt mit je 75 cm^3 Eisessig, der bei 10° mit Bromwasserstoff (es ist nicht ratsam, eine Säure mit höherer Konzentration in bezug auf Bromwasserstoff anzuwenden, da die Menge des Nebenprodukts um so größer wurde, je konzentrierter die Säure war) gesättigt ist, und trägt in jedes Kölbchen allmählich und unter fortwährendem Schütteln je 5 *g* bei 100° getrocknetes Hämin ein. Man läßt nun 3—4 Tage bei Zimmertemperatur stehen, während welcher Zeit die Masse des öfteren bewegt wird, bis sich alles Hämin gelöst und die Lösung die schön rote Farbe des Hämatoporphyrins angenommen hat. Jetzt wird der Kölbcheninhalt in $^1/_2$ Liter destilliertes Wasser eingetragen, wobei ein Niederschlag entsteht, der ein Nebenprodukt des Hämatoporphyrins von nicht einheitlicher Art vorstellt, während der gewünschte Farbstoff selbst als Salz in Lösung geht. Die nach einigen Stunden filtrierte Lösung wird so lange mit Natronlauge versetzt, bis aller Bromwasserstoff neutralisiert ist, wobei der in verdünnter Essigsäure unlösliche Farbstoff fast vollständig ausfällt. Man läßt absitzen und wäscht den Niederschlag durch Dekantation Br-frei, worauf er in reiner verdünnter Natronlauge gelöst wird; es geschieht dies, um geringe Mengen beigemischten Eisensalzes zu entfernen. Die Lösung wird also filtriert und das Filtrat wiederum durch Essigsäure gefällt, das abgeschiedene Hämatoporphyrin auf ein gehärtetes Filter gebracht, rein ausgewaschen, abgesaugt, vom Filter abgehoben und mit wenig Wasser in einer Schale zu einem dicken Brei angerührt. Unter Umrühren versetzt man nun mit kleinen Portionen Salzsäure so lange, bis der Farbstoff in Lösung gegangen ist, wobei man auf 75° erwärmen kann. Es ist zu beachten, daß das Hämatoporphyrin in Salzsäure von ca. 0·7% am leichtesten löslich ist. Nach erfolgter Lösung filtriert man von geringen harzigen Rückständen und fügt zum Filtrat etwa $^1/_{10}$ Vol. 40%iger Salzsäure, wodurch die Löslichkeit des Farbstoff-

[1]) *F. Hoppe-Seyler*, Beiträge zur Kenntnis des Blutes des Menschen und der Wirbeltiere. Med. chem. Unters. Heft 4. S. 544 (1871).

[2]) *M. Nencki* und *N. Sieber*, Über das Hämatoporphyrin. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. Bd. **24**. S. 430 (1888). — Monatshefte f. Chem. Bd. **9**. S. 115. Bd. **10**. S. 568. — *M. Nencki*, Omnia opera. II. S. 74 und 754. — *M. Nencki* und *J. Zaleski*, Untersuchungen über den Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 390 (1900).

salzes herabgedrückt wird. Sollte jetzt sogleich noch ein harziger Niederschlag entstehen, so filtriert man von neuem davon ab und stellt das Filtrat im Vakuum über Schwefelsäure 2—3 Tage auf, wonach die ausgeschiedenen Kristalle abgesaugt und mit 10%iger Salzsäure nachgewaschen werden. Ausbeute nach *Nencki* 92% des verwendeten Hämins.

Durch einmaliges Umlösen mit Hilfe von auf 75° erwärmter, 0·7%iger Salzsäure und Zusatz von $^1/_{10}$ Volumen konzentrierter Salzsäure (1·19) wird das salzsaure Hämatoporphyrin rein erhalten (*Zaleski*[1]). Die Kristalle, lange dünne, nach beiden Enden zugespitzte, zu Büscheln vereinigte Nadeln, werden zwischen Fließpapier abgepreßt, sodann im Exsikkator über Schwefelsäure und Natronkalk bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Jedes Erwärmen ist zu vermeiden, da unter Entweichen von Chlorwasserstoff Zersetzung eintritt, auch erleiden die Kristalle beim Lösen in Wasser hydrolytische Spaltung. Ihre Lösung in Wasser weist zwei Absorptionsbänder auf, einen schmalen, nicht sehr dunklen Streifen im Orange zwischen C und D nahe an D, und einen zweiten breiteren, dunklen zwischen D und E. Der Raum zwischen beiden zeigt matte, schwache Absorption.

Auf Zusatz überschüssiger Natronlauge verändert sich das Spektrum und man beobachtet nun vier Streifen im Rot, Gelb und Grün, von denen der zwischen E und F liegende am breitesten ist. Eine solche Lösung enthält das ebenfalls kristallinisch gewinnbare Natriumsalz des Hämatoporphyrins, welcher Körper also auch saure Eigenschaften besitzt. Im freien Zustande ist es bisher nur im amorphen Zustande erhalten worden, und zwar dadurch, daß man die Lösung des salzsauren Salzes in schwach angesäuertem Wasser mit Natriumacetat versetzt. Das in braunroten amorphen Flocken abgeschiedene Hämatoporphyrin wird dann auf einem Filter gesammelt, vollständig ausgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Ein Erhitzen im Luftbade bei 100° verträgt es nicht. Außer in Alkalien, auch in Karbonaten, und in verdünnten Mineralsäuren löst sich Hämatoporphyrin auch in Alkohol; in Äther, Chloroform, Amylalkohol ist es unlöslich.

Nach den Ergebnissen der Analyse und den am Mesoporphyrin, das unter ähnlichen Bedingungen wie das Hämatoporphyrin bei der Einwirkung von Jodwasserstoff entsteht und sich nur durch einen Mindergehalt von zwei Sauerstoffatomen unterscheidet, von *Zaleski*[1]) ausgeführten Molekulargewichtsbestimmungen kommt dem Hämatoporphyrin die durch die Formel $C_{34}H_{38}O_6N_4$ ausdrückbare Zusammensetzung zu. Es ist eine zweibasische Säure, von der sich kristallisierte Ester oder Äther herstellen lassen, und es enthält zwei dreiwertige Stickstoffatome, das salzsaure Salz ist also nach der Formel $C_{34}H_{38}O_6N_4\,2\,HCl$ zusammengesetzt. Nach allem kann die Bildung des Hämatoporphyrins durch die Gleichung $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl + 2\,HBr + 2\,H_2O = FeBr_2Cl + C_{34}H_{38}O_6N_4$ wiedergegeben werden. (Bei Zu-

[1]) *J. Zaleski*, Untersuchungen über das Mesoporphyrin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 59/61 (1902).

grundelegung der Formel $C_{34}H_{33}O_4N_4FeCl$ mit zweiwertigem Eisen, für welche spricht, daß jedenfalls ein Teil des Eisens durch den Bromwasserstoff als Ferrosalz abgespalten wird, würde die Gleichung lauten:

$$C_{34}H_{33}O_4N_4FeCl + HBr + 2H_2O = C_{34}H_{38}O_6N_4 + FeClBr.)$$

V. Darstellung des Mesoporphyrins.

Für die Darstellung des schon erwähnten Mesoporphyrins $C_{34}H_{38}O_4N_4$, das in jeder Beziehung dem Hämatoporphyrin gleicht, gibt *Zaleski*[1]) die folgende Vorschrift: 2 *g* Hämin (auch hier ist es empfehlenswert, nur geringe Mengen von Hämin auf einmal in Arbeit zu nehmen) werden in einem kleinen Kölbchen mit 30 cm^3 Eisessig und 6 cm^3 Jodwasserstoffsäure (1·7) behandelt: das Kölbchen wird über stark kochendem Wasserbade bis zu vollständiger Lösung des Farbstoffes gelassen, was bei öfterem Umschütteln des Kölbchens $^1/_4$ Stunde in Anspruch nimmt. Es werden dann der Lösung 3 cm^3 Wasser zugesetzt und dann wirft man nach und nach Phosphoniumjodid in kleinen Portionen hinein. Man muß fortwährend den Inhalt des Kölbchens schütteln und dasselbe auf einem nur mäßig warmen Wasserbade erwärmen. Nach Verlauf einer Viertelstunde, wenn die Menge des hinzugefügten Phosphoniumjodids 2—2·5 *g* beträgt, wird der Inhalt des Kölbchens in 2 Wasservolumina hineingegossen und mit 60 cm^3 20%iger Natronlauge behandelt. Der Farbstoff schlägt sich sofort nieder. Die Aufgabe besteht nun darin, diesen Niederschlag möglichst schnell auf ein Filter zu bringen und aus Salzsäure umzukristallisieren, da er sich nach längerem Stehen zersetzt und es nach einigen Stunden unmöglich ist, daraus Kristalle zu erhalten. Man sammelt also den Farbstoff mit Hilfe der Saugpumpe auf einem Filter, wäscht zweimal mit Wasser aus, überträgt ihn in einen Kolben, setzt $^1/_2$ *l* 1%iger Salzsäure hinzu und erhitzt bis zum Kochen. Man muß dann noch 20 cm^3 40%iger Salzsäure hinzufügen, filtriert, setzt, wenn sich die Flüssigkeit ein wenig abgekühlt hat, noch 50 cm^3 starker Salzsäure hinzu und bringt sie dann in einer Schale in das Vakuum, wonach das salzsaure Mesoporphyrin allmählich kristallisiert. Ausbeute: 10—30% vom verwendeten Hämin.

VI. Darstellung des Hämopyrrols.

A. Das Hämopyrrol *Nenckis*[2]) bildet sich nur bei sehr energischer Reduktion des Hämins und wurde bisher in einer Menge erhalten, aus der man schließen kann, daß die Hälfte des Häminmoleküls in das flüchtige Reduktionsprodukt übergeführt werden kann.

[1]) *J. Merunowicz* und *J. Zaleski*, Untersuchungen über Hämine. Extrait du Bulletin de l'Académie des Sciences de Cracovie. Juli 1907. p. 640/1.

[2]) *M. Nencki* und *J. Zaleski*, Über die Reduktionsprodukte des Hämins durch Jodwasserstoff und Jodphosphonium. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **34**. S. 997 (1901). Omnia opera *M. Nencki*. II. S. 792.

Zur Darstellung des Hämopyrrols[1]) werden 5 *g* getrocknetes, möglichst reines Hämin mit 100 *cm*³ Eisessig in einem Erlenmeyerkolben übergossen und dann 50 *cm*³ Jodwasserstoffsäure (spez. Gew. 1·96—2·0) hinzugefügt. Man läßt die Masse 48 Stunden unter öfterem Schütteln stehen, nach welcher Zeit sich der größte Teil des Hämins gelöst hat. Zur völligen Lösung erwärmt man nun eine Viertelstunde auf stark siedendem Wasserbade und vollendet die Reduktion alsdann in einer weiteren Viertelstunde durch allmähliches Eintragen von Phosphoniumjodid, wovon 10 *g* ausreichen, um die anfangs dunkelrotbraune Färbung der Lösung in eine braungelbe umschlagen zu lassen. Wenn jetzt eine Probe der Flüssigkeit auf Zusatz von Wasser nicht getrübt wird (im anderen Fall muß das Erwärmen und der Zusatz von Phosphoniumjodid noch fortgesetzt werden), versetzt man die ganze Menge derselben mit 20 *cm*³ eiskalten Wassers, wonach eine klare, hellgelbe Lösung resultiert.

Diese wird durch eine Kältemischung auf 0° abgekühlt, worauf mit der Neutralisation der Jodwasserstoffsäure begonnen werden kann, die durch Zufügen von 50 *cm*³ einer 40 volumprozentigen Natronlauge unter Umrühren und mit der Vorsicht erfolgt, daß die Temperatur nicht über 10° steigt. Die alsdann nur durch eine kleine Menge eines hellroten Harzes schwach getrübte Flüssigkeit wird darauf in einen Rundkolben von ca. 800 *cm*³ Inhalt gebracht, der mit einem dreifach durchbohrten Stopfen versehen ist. Durch diese Bohrungen führen die Zuleitungsröhren für den Wasserdampf, eine Trichterröhre und eine die Verbindung mit einem guten, langen Kühler herstellende Röhre. Während nun sofort Wasserdampf eingeblasen wird, läßt man durch die Trichterröhre noch 110 *cm*³ der Lauge im Laufe einer Stunde eintröpfeln und erhitzt mit Hilfe der Neutralisationswärme die Flüssigkeit rasch, so daß die Abdestillation des Hämopyrrols mit einem Teil der Essigsäure und dem Wasserdampf in kurzer Zeit eintritt. Von letzterem lasse man nur einen mäßigen Strom eintreten, so daß nach einer Stunde nur etwa 350—400 *cm*³ Destillat erhalten werden. In dieser Zeit ist dann das gebildete Hämopyrrol auch so gut wie vollständig abgeblasen worden, was daran zu erkennen ist, daß Sublimatlösung im Destillat keine Fällung, sondern nur noch Opaleszenz gibt. Ferner hat sich das übergegangene Hämopyrrol, das zunächst in Form öliger Tropfen erscheint, die leicht an ihrem charakteristischen, zugleich an Indol und Naphtalin erinnernden Geruch zu erkennen sind, nun auch in der verdünnten Essigsäure völlig gelöst. Diese Lösung nimmt an der Luft und im Licht schnell eine bräunliche Färbung an; das Hämopyrrol ist ein äußerst leicht zersetzlicher Körper, der bisher auch nur in Form von Verbindungen zur Analyse gebracht werden konnte. Als solche sind ein Doppelsalz mit Quecksilberchlorid und ein Azofarbstoff aufzuführen, der mit Hilfe von

[1]) *W. Küster,* Über die Konstitution des Hämopyrrols. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 2953 (1904); *Liebigs* Ann. d. Chemie. Bd. **346**. S. 1 u. 23. — Derselbe, Beiträge zur Kenntnis des Hämatins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **55**. S. 526 (1908).

Benzoldiazoniumchlorid[1]) erhalten wird. Die erste Verbindung erhält man durch Zusatz von Sublimatlösung zu der essigsauren Lösung des Hämopyrrols als weißen amorphen Niederschlag, der sich gut filtrieren und durch Wasser auswaschen läßt, er wird dann zunächst auf Fließpapier, schließlich im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, wobei man zweckmäßig das Licht ausschließt.

Die Zusammensetzung läßt sich nach *Nencki* durch die Formel $(C_8 H_{12} N)_2$ Hg, 4 Hg Cl_2 wiedergeben.

Durch Oxydation mit Chromsäure geht das Hämopyrrol in Methyläthylmaleïnimid über. Zur Darstellung desselben fängt man nach *W. Küster*[2]) das aus 5 *g* Hämin entwickelte Hämopyrrol in 100 cm^3 einer 20 volumprozentigen Schwefelsäure auf, und zwar leite man die Destillation so, daß in 1 Stunde höchstens 400 cm^3 übergangen sind, die Menge des Destillats also nicht mehr als $^1/_2$ *l* beträgt. Diese stark saure Flüssigkeit schüttle man nun 3—4mal mit je 200 cm^3 Äther aus, wodurch Essigsäure und ein Bestandteil des *Nencki*schen Hämopyrrols — das sogenannte saure Hämopyrrol — entfernt werden. Der Äther wird dann sofort abdestilliert, der stark gefärbte Rückstand mit 20—30 cm^3 75%iger Essigsäure in ein Becherglas gespült und sofort 2 cm^3 10%iger Chromsäurelösung zugefügt. Ist nach Verlauf von ca. 10 Minuten die Chromsäure verbraucht, d. h. gibt ein Tropfen der Lösung mit Bleiacetat keine gelbe Fällung mehr, so trage man von neuem 2 cm^3 des Oxydationsmittels ein und fahre mit dem Zusatz so lange fort, bis sich auch nach Stunden noch eine positive Reaktion mit der Bleilösung einstellt. Dazu werden etwa 10 cm^3 der Chromsäurelösung erforderlich sein, so daß jedenfalls am Tage nach Beginn der Oxydation die weitere Verarbeitung erfolgen kann, die darin besteht, daß die Essigsäure unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand in wenig warmem Wasser gelöst, die Lösung filtriert und mit Sodalösung gerade alkalisch gemacht wird. Extrahiert man jetzt erschöpfend mit Äther, trocknet den ätherischen Auszug mit Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel ab, so kristallisiert der in eine kugelförmige Kristallierschale gebrachte Rückstand sehr bald in langen noch gelb gefärbten Nadeln, von sehr charakteristischem, an Jodoform erinnernden Geruch. Ausbeute: ca. 0·4 *g*. Zur Reinigung wird das Rohimid in Äther aufgenommen und diese Lösung mit 40%iger Salzsäure ausgeschüttelt, so lange diese noch Farbstoff wegnimmt, wozu im ganzen nur wenige Kubikzentimeter der Säure nötig sind. Die fast entfärbte ätherische Lösung wird dann mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, darauf verdampft. Jetzt hinterbleiben beinahe farblose Nadeln, welche nach dem Aufstreichen auf

[1]) *L. Marchlewski,* Untersuchungen über den Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **45**. S. 182; Bd. **47**. S. 331; Bd. **51**. S. 464; Bd. **54**. S. 151. — Derselbe, Zur Kenntnis des Hämopyrrols. Biochem. Zeitschr. Bd. **10**. S. 437.

[2]) *W. Küster,* Über die Konstitution des Hämopyrrols. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 2953 (1904); *Liebigs* Annal. d. Chem. Bd. **346**. S. 1 u. 23. — Derselbe, Beiträge zur Kenntnis des Hämopyrrols. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **55**. S. 526 (1908).

Ton und Betupfen mit reinstem Äther den Schmelzpunkt 67—68°, der für das Methyläthylmaleïnimid charakteristisch ist, aufweisen.

Während die Oxydation des sauren Hämopyrrols bereits in Angriff genommen wird, schreitet man auch sofort zur Isolierung eines zweiten Bestandteils des *Nencki*schen Hämopyrrols, der noch in der sauren Lösung enthalten ist, aus der das „saure Hämopyrrol" durch Äther entfernt wurde.

Sie wird stark abgekühlt und dann durch Zusatz von ca. 90 cm^3 einer 40 volumprozentigen Natronlauge mit der Vorsicht alkalisch gemacht, daß sich die Flüssigkeit nicht bis zum Sieden des Äthers erwärmt. Sobald alkalische Reaktion eingetreten ist, wird auch diese Lösung drei- bis viermal mit je 200 cm^3 Äther extrahiert, wodurch nun das „basische Hämopyrrol" entfernt wird. Auch hier wird der Äther sogleich abdestilliert, der intensiv gefärbte Rückstand in ca. 40 cm^3 75%iger Essigsäure gelöst, darauf alle die Operationen von der Oxydation durch Chromsäure an bis zur Reinigung des Rohimids vorgenommen, wie sie beim sauren Hämopyrrol soeben geschildert wurden. Die Ausbeute an Rohimid beträgt ca. 0·5 *g*, das gereinigte Imid erweist sich durch seinen Schmelzpunkt und durch die Analyse ebenfalls als mit dem Methyläthylmaleïnimid identisch.

Nach diesen Befunden darf das *Nencki*sche Hämopyrrol als ein Gemisch aufgefaßt werden, in welchem ein Körper vorhanden ist mit ausgesprochen basischen Eigenschaften, während bei einem zweiten der basische Charakter gegenüber schwach sauren Eigenschaften zurücktritt. Da beide Pyrrolderivate sind, worauf die Rotfärbung eines mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspans und die Fähigkeit mit Benzoldiazoniumchlorid zu reagieren hinweisen und die Oxydation es bestätigt, kommt für das „basische Hämopyrrol" die Konstitution eines α-Methyl-ββ'-Methyläthylpyrrolins, für das saure die eines gleich substituierten Pyrrols in Betracht. Die Oxydation würde sich dann nach folgendem Schema vollziehen:

$$\begin{array}{l} H_3C-C=C.CH_3 \\ \quad\;\; | \qquad\quad \rangle NH \\ H_5C_2-C=CH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} H_3C-C-CO \\ \quad\;\; \| \qquad\quad \rangle NH. \\ H_5C_2-C-CO \end{array}$$

VII. Darstellung der Hämatinsäuren.

Die Hämatinsäuren $C_8H_9O_4N$ und $C_8H_8O_5$, erkannt als Imid und als Anhydrid einer dreibasischen Säure, die als 1-Methyl-2-Carboxyäthylmaleïnsäure bezeichnet werden kann, entstehen bei der Oxydation des Hämins, Hämatoporphyrins und des Hämatins durch die verschiedensten Mittel — Salpetersäure, Wasserstoffsuperoxyd, Chromsäure in essigsaurer, Natriumhypobromit, Ferricyankalium, Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung seien genannt —, und zwar bilden sich im allgemeinen um so größere Mengen von Hämatinsäure, je größer die Menge des Oxydationsmittels in bezug auf das zur Verwendung gelangende Hämatin ist, erst von einer bestimmten Grenze an wird wieder eine Herabminderung der Ausbeute be-

merkbar, dann zeigt aber auch sogleich das reichliche Auftreten von Bernsteinsäure und Kohlensäure, daß dies durch eine Zerlegung primär entstandener Hämatinsäure bedingt ist.

Des weiteren ist aber bemerkenswert, daß schon sehr geringe Mengen von Sauerstoff hinreichen, um in saurer Lösung Hämatinsäure zu bilden, allerdings in geringer Menge, während in alkalischer Lösung wenige Atome Sauerstoff von der Molekel Hämatin zunächst einmal aufgenommen werden, ohne daß es zu ihrem Zerfall und zur Bildung von Hämatinsäure kommt (*W. Küster*[1]).

Zur Herstellung größerer Mengen von Hämatinsäuren bedient man sich am besten der Oxydation mit Chromsäure in essigsaurer Lösung und verfährt wie folgt:

25 *g* Rohhämin nach *Mörner* werden in einer Reibschale mit Alkohol angerieben und mit ca. $2^1/_2$ *l* 0·2%iger Natronlauge in eine Flasche übergespült, die alsdann geschüttelt wird, bis vollständige Lösung erfolgt zu sein scheint. Man filtriert durch ein Kreppfilter (Dreverhoff), bringt noch nicht gelöstes Hämin durch Zusatz neuer Natronlauge völlig in Lösung, fällt das Filtrat durch Essigsäure im Überschuß und bringt den sehr voluminösen Hämatinschlamm auf große gehärtete Filter (Dreverhoff Nr. 495), wonach er mit lauem Wasser ausgewaschen wird. Man saugt nun noch ab und breitet auf Fließpapier aus, um die Hauptmenge des anhängenden Wassers zu entfernen; nach einigen Stunden ist dann der Kuchen — er mag noch ca. 50% Feuchtigkeit enthalten — bröcklig geworden und läßt sich mit einem Porzellanspatel gut abheben. Das aus der angegebenen Menge Hämin erhaltene Hämatin wird nun in 1·5 *l* Eisessig von 100% eingetragen, die sich in einem Becherglase mit ca. 3—4 *l* befinden; beim vorsichtigen Umrühren und Umschwenken löst sich das Hämatin rasch auf oder verteilt sich wenigstens so fein, daß beim Filtrieren meist nur ein geringer Rückstand bleibt, der bei weiterer Behandlung mit Eisessig ebenfalls in Lösung geht. Man kann also die Filtration unterlassen, die Lösung aber durch mäßiges Erwärmen auf dem Wasserbade beschleunigen, muß aber dann vor dem Eintragen der Chromsäure wieder auf Zimmertemperatur abkühlen lassen. Zur Oxydation verwendet man am besten 21 Atome Sauerstoff auf die Hämatinmolekel, bei 25 *g* Hämin wird die entsprechende Sauerstoffmenge von 55 *g* reinem Chromtrioxyd geliefert, die in Eisessig gelöst auf einmal in die Hämatinlösung eingetragen werden. Man sorgt bei Zimmertemperatur für gehörige Mischung und beginnt sogleich mit dem Abdestillieren der Essigsäure unter vermindertem Druck.

---

[1]) *W. Küster*, Über die Konstitution der Hämatinsäuren. *Liebigs* Annal. Bd. **315**. S. 174 (1900); Bd. **345**. S. 1 (1905); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **33**. S. 3021; Bd. **35**. S. 2948. — Derselbe, Spaltungsprodukte des Hämatins und Hämatoporphyrins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **28**. S. 1 und 34; Bd. **29**. S. 185 (1899/1900). — Derselbe, Beiträge zur Kenntnis des Hämatins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **44**. S. 391 (1905). — Derselbe, Über einige Salze, Ester und Anilinderivate der Hämatinsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **54**. S. 501 (1908).

wobei zweckmäßig zwei Fraktionskolben von je 1 *l* Inhalt gleichzeitig in bekannter Weise benutzt werden: das Erhitzen geschieht im Wasserbade.

Während die Essigsäure abdestilliert, was etwa $^3/_4$—$^5/_4$ Stunden in Anspruch nimmt, vollzieht sich die Aufnahme des Sauerstoffs, so daß der Rückstand an heißes Wasser, in welchem er bis auf geringe Reste löslich ist, sobald 21 Atome Sauerstoff pro Hämatinmolekül verwendet worden sind, meist keine freie Chromsäure mehr abgibt. Ist das doch der Fall (vgl. S. 627, Z. 2 v. o.), so kann sie durch eine zweite Destillation der wässerigen Lösung unter vermindertem Druck sicher beseitigt werden. Nachdem dann der Rückstand von neuem mit heißem Wasser aus dem Fraktionskolben herausgespült worden ist, filtriert man von den nicht gelösten Anteilen ab, die, wie erwähnt, im gegebenen Falle nur gering sind, d. h. etwa 5% vom verwendeten Hämatin betragen und eisenhaltig sind, und erhitzt das Filtrat solange unter Erneuerung des verdampfenden Wassers auf dem Wasserbade, bis der Geruch nach Essigsäure auch aus der schließlich konzentrierten Lösung verschwunden ist, was 2—4 Tage in Anspruch nehmen kann und wonach sich noch unlöslich gewordene Partikel abgeschieden haben, von denen filtriert wird. Zum Filtrat wird zunächst die Menge Schwefelsäure hinzugefügt, welche nötig ist, um alles Chrom in Chromisulfat überzuführen, in unserem Fall also 410 *g* 20%iger Säure, und das Verdampfen fortgesetzt, bis die in Freiheit gesetzte Essigsäure ebenfalls vollständig entwichen ist, wobei es zu einer geringen Harzabscheidung kommen kann, von der wiederum filtriert wird, worauf das Filtrat noch mit einem Überschuß von Schwefelsäure, von etwa 200 *g* 20%iger Säure versetzt und nochmals längere Zeit auf dem Wasserbade digeriert wird, wobei man auf ein kleines Volumen, etwa 1 *l*, eindampft. Die erkaltete Lösung wird mit etwa dem gleichen Volumen Äther mehrere Male ausgeschüttelt, bis sich der Äther nicht mehr färbt. Oft gibt eine bereits erschöpfend mit Äther extrahierte Lösung von neuem Substanz an diesen ab, nachdem sie von neuem nach Zusatz von etwas Schwefelsäure auf dem Wasserbade erwärmt wurde. Nach Abdestillation des Äthers erhält man dann die rohe Hämatinsäure, ca. 15 *g*, bei Verwendung von 25 *g* Hämin. Um schwerer in Äther lösliche Säuren, die ebenfalls bei der Oxydation des Hämatins entstanden sind, zu gewinnen, empfiehlt es sich, die Extraktion mit Äther in einem der zu diesem Zweck konstruierten Apparate vorzunehmen.

Die Reinigung beginnt damit, daß man die rohe Säure in kalter Sodalösung aufnimmt und diese alkalische Lösung mehrere Male mit Äther extrahiert, wodurch sehr geringe Mengen basischer Substanz von noch nicht aufgeklärter Zusammensetzung entfernt werden. Die durch schwaches Erwärmen vom gelösten Äther befreite Flüssigkeit wird nun mit verdünnter Schwefelsäure ziemlich stark sauer gemacht und einen Tag sich selbst überlassen, wonach eine klare Lösung resultiert, die von einem abgesetzten, harzigen Produkt abgegossen werden kann, worauf sie von neuem mit Äther extrahiert wird, nach dessen Abdunsten eine gereinigte Rohsäure erhalten wird (etwa 13·5 *g*). Diese löst man nunmehr in kaltem Wasser

und setzt 0·6 *g* fein geschlämmtes Calciumkarbonat hinzu, welche etwa dem sechsten Teil der zur völligen Neutralisation nötigen Menge entsprechen, falls die gesamte gereinigte Rohsäure aus der einbasischen Substanz $C_8H_9O_4N$ bestehen würde. Das ist nicht immer der Fall, vielmehr enthält sie geringe Mengen von Bernsteinsäure und andere Säuren von noch nicht bekannter Zusammensetzung, daneben häufig größere Mengen der zweiten Hämatinsäure $C_8H_8O_5$. Alle diese werden als Säuren von stärker saurem Charakter wie die stickstoffhaltige Hämatinsäure in Salze übergeführt, so daß nunmehr Äther die letztere in fast reinem Zustande aufnimmt. Die ausgeätherte Kalksalzlösung gibt beim Erhitzen auf dem Wasserbade dann einen Ausfall, wenn größere Mengen der stickstofffreien Hämatinsäure vorhanden sind, was eintreten kann, wenn bei der Oxydation die Temperatur zu hoch war. In diesem Fall kann der ätherische Extrakt auch nach der ersten Behandlung mit Calciumkarbonat noch beide Hämatinsäuren enthalten, so daß es sich empfiehlt, die soeben beschriebene Behandlung mit Calciumkarbonat zu wiederholen. Aus den Kalksalzen sind beide Hämatinsäuren nach dem Lösen in Salzsäure durch Extraktion mit Äther leicht wiederzugewinnen. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels bleibt sie denn auch schon in großen, allerdings noch gelb gefärbten Kristallen zurück, welche durch Umkristallisation aus etwa der gleichen Menge heißen Wassers leicht gereinigt werden können.

B. Das Imid der dreibasischen Hämatinsäure

$$C_8H_9O_4N = \begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\qquad\quad H_3C-C\;\;\;CO \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\;\; \diagup NH \\ COOH-CH_2-CH_2-C-CO \end{array}$$

kristallisiert in monoklinen Prismen, die zu Zwillingen derartig verwachsen sind, daß die Kristalle rhombischen Habitus erhalten. Die Substanz ist in Wasser, Alkohol, Äther, Essigester, namentlich in der Wärme, leicht löslich und schmilzt bei 114°. Sie verhält sich wie eine einbasische Säure und gibt mit einer Anzahl zweiwertiger Metalle, z. B. Ca, Zn, Cd, gut kristallisierende Salze von der allgemeinen Formel $(C_8H_8O_4N)_2Me''$. Silber kann nicht nur den Wasserstoff der Karboxylgruppe, sondern auch den der Imidgruppe vertreten, doch entsteht beim Fällen einer mit Ammoniak neutralisierten Lösung der Säure in absolutem Alkohol mit einer weingeistigen Silbernitratlösung in der berechneten Menge neben dem Salz $C_8H_7Ag_2O_4N$ auch noch ein Salz $C_8H_9Ag_2O_5N$, was mit einer Aufspaltung der Imidgruppe zusammenhängen muß. Wie denn überhaupt die letztere leicht verseift wird und schon beim Eindampfen einer wässerigen Lösung des Kalksalzes immer ein kleiner Teil derselben in das unlösliche Kalksalz der Hämatinsäure $C_8H_8O_5$ übergeht. Nebenbei sei bemerkt, daß die eben erwähnte Lösung ein ganz vorzüglicher Nährboden für allerhand Pilze sein dürfte.

C. Zur Überführung des Imids in das Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure bedient man sich am besten des Barytwassers. Eine wässerige Lösung der stickstoffhaltigen Säure wird damit stark alkalisch gemacht

und dann auf dem Wasserbade erhitzt: unter Ammoniakentwicklung fällt allmählich das in der Hitze unlöslich werdende Baryumsalz der stickstofffreien Säure aus.

Da die letztere dreibasisch ist, das Imid, $C_8H_9O_4N$, aber nur einbasisch, so wird, falls nicht von vornherein ein großer Überschuß von Baryt verwendet worden ist, im Laufe der Umsetzung, die schon bei Verwendung von 2 *g* des Imids 4—5 Stunden dauert, vielleicht die alkalische Reaktion verschwinden, die alsdann durch Zusatz von Barytwasser wieder herzustellen ist. Sobald sich kein Ammoniak mehr entwickelt, dampft man zur Trockne ein, nimmt den Rückstand mit verdünnter Salzsäure auf und extrahiert die Lösung erschöpfend mit Äther. Der Rückstand der ätherischen Auszüge besteht zum größten Teil aus dem Anhydrid, $C_8H_8O_5$; zur Abtrennung etwa noch vorhandener unverseifter Substanz löst man ihn in der 3—4fachen Menge heißen Wassers und lasse unter stetem Umrühren erkalten, wobei sich die Hauptmenge des Anhydrids in feinen Kristallen abscheidet, die durch Absaugen von der Mutterlauge getrennt und durch Nachwaschen mit eiskaltem Wasser gereinigt werden können. Die Mutterlauge sättigt man darauf in der Kälte mit Barytwasser und erhitzt die Salzlösung auf dem Wasserbade, worauf sich der Rest der Säure $C_8H_8O_5$ als unlösliches Baryumsalz abscheidet, aus dem, wie schon angegeben, die Säure regeneriert wird, wonach sie durch Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt wird.

D. Das Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure $C_8H_8O_5$ kann in recht verschiedenen Kristallformen auftreten, je nach den Bedingungen, unter denen es sich abscheidet, und je nach dem verwendeten Lösungsmittel. Beim langsamen Verdunsten einer ätherischen Lösung können bis 15 *mm* große rhombische Kristalle von teils kurzprismatischem, teils dicktafelförmigem Habitus erhalten werden. Der Schmelzpunkt der Substanz liegt bei 97—98°, in den meisten organischen Solventien ist sie namentlich in der Wärme leicht löslich; daß man sie zweckmäßig aus der dreifachen Menge heißen Wassers umkristallisiert, wurde bereits angegeben, hierbei scheidet sich oft zuerst ein Öl aus, das allmählich in die Kristalle übergeht.

In wässeriger Lösung verhält sich das Anhydrid $C_8H_8O_5$ wie eine dreibasische Säure $C_8H_{10}O_6$, von der sich auch das beim Eingießen der berechneten Menge Silbernitratlösung in eine durch Ammoniak neutralisierte Lösung des Anhydrids entstehende Silbersalz ableitet, dem also die Zusammensetzung $C_8H_7Ag_3O_6$ zukommt, auch ein Trimethylester ist bekannt, die Säure selbst hat aber bisher noch nicht dargestellt werden können. Sehr charakteristisch ist das Verhalten der Erdalkalisalze und das des Kupfersalzes: die wässerige Lösung des Anhydrids $C_8H_8O_5$ zersetzt die Karbonate der erwähnten Metalle unter lebhafter Kohlensäureentwicklung, man erhält in der Kälte eine klare Lösung, die beim Erwärmen eine fast quantitative Ausscheidung der Salze gibt. Dieser Niederschlag ist, wenn er ein Erdalkalimetall enthält, kristallisiert und enthält auf 4 Moleküle $C_8H_8O_5$ 5 Atome Metall, so daß die Zusammensetzung z. B. durch die Formel $C_{32}H_{28}Ca_5O_{23}$

oder $C_{32}H_{30}Ba_5O_{24}$ wiedergegeben werden kann. Im Gegensatz zu den erwähnten Salzen fallen die des Magnesiums, Zinks und Cadmiums beim Erwärmen ihrer kalt bereiteten Lösungen nicht aus.

E. Die Umwandlung des Anhydrids in das Imid der dreibasischen Hämatinsäure kann entweder durch Erhitzen mit alkoholischem Ammoniak auf 110° erfolgen oder mit Benutzung der Ester der Säuren auf folgendem Wege:

10 *g* $C_8H_8O_5$ werden in 40 *g* absoluten Alkohols gelöst und so viel möglichst konzentrierte Salzsäure hinzugegeben, daß die Lösung ca. 2% Chlorwasserstoff enthält, worauf 5 Stunden am Rückflußkühler erhitzt wird; nun wird der Alkohol vollständig abdestilliert und der Rückstand mit etwa 100 cm^3 Wasser versetzt. Das abgeschiedene Estergemisch wird im Scheidetrichter von der wässerigen Lösung, welche unveränderte Hämatinsäure in geringer Menge enthält, getrennt, darauf in Äther gelöst, die ätherische Lösung mit wässerigem Ammoniak ausgeschüttelt, die wässerige Lösung von der ätherischen getrennt (in der ätherischen Lösung verbleibt der Diäthylester der dreibasischen Hämatinsäure, der durch Ammoniak nur langsam gelöst und dabei wieder zu Hämatinsäure verseift wird) und im Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Rückstand ist nunmehr in Wasser unlöslich geworden, löst sich aber in Äther und stellt den Äthylester des Imids der dreibasischen Hämatinsäure vor.

Durch die Veresterung haben sich vornehmlich 2 Derivate von $C_8H_8O_5$ gebildet, ein Monoäthylester des Anhydrids $C_{10}H_{12}O_5$ und ein aus zwei solchen Molekülen unter Hinzutritt von Wasser gebildetes Produkt $C_{20}H_{26}O_{11}$; beide Ester werden durch wässeriges Ammoniak in das Diammoniumsalz des Monoäthylesters der dreibasischen Hämatinsäure $C_{10}H_{20}O_6N_2$ übergeführt, das alsdann beim Eindampfen seiner Lösung unter Verlust von Wasser und Ammoniak den Äthylester des Imids $C_{10}H_{13}O_4N$ liefert:

$$H_7C_5\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!>O \\ \quad COOC_2H_5 \quad + 2\,NH_3 + H_2O = H_7C_5\begin{cases}COONH_4\\COONH_4\\COOC_2H_5\end{cases}$$

$$H_7C_5\begin{cases}COONH_4\\COONH_4\\COOC_2H_5\end{cases} - NH_3 - H_2O = H_7C_5\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!>NH \\ \quad COOC_2H_5$$

Zur Verseifung des öligen Esters wird 1 Gewichtsteil desselben mit 10 Gewichtsteilen 10%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbade eine halbe Stunde lang erwärmt, bis klare Lösung eingetreten ist, die dann nach dem Erkalten ausgeäthert wird, wobei reine Hämatinsäure $C_8H_9O_4N$ erhalten wird.

F. Zur Überführung des Imids der dreibasischen Hämatinsäure $C_8H_9O_4N$ in das Imid der Methyläthylmaleïnsäure $C_7H_9O_2N$ werden 5 *g* des ersteren in einem kleinen Fraktionierkolben auf dem Sandbade erhitzt, wobei unter Entwicklung von Kohlendioxyd die Hauptanteile bei ca. 190° übergehen. Das Destillat, 3—3·5 *g*, ist dickflüssig und stark gefärbt, riecht

brenzlich und zugleich an Jodoform erinnernd. Durch eine zweite Destillation unter vermindertem Druck wird eine gelbe, ölige Flüssigkeit erhalten, welche beim Erkalten bereits in spitzen Nadeln kristallisiert. Die Reinigung derselben kann, wie auf Seite 627, Z. 6 v. u. bereits angegeben, erfolgen: alle Eigenschaften weisen darauf hin, daß in ihnen das Imid der Methyläthylmaleïnsäure

$$\begin{matrix} H_3C . C - CO \\ \| \\ H_5C_2 . C - CO \end{matrix} \Big\rangle NH$$

vorliegt. Durch Verseifung dieses Imids oder durch trockene Destillation des Anhydrids der dreibasischen Hämatinsäure kann das Anhydrid der Methyläthylmaleïnsäure $C_7H_8O_3$ erhalten werden, ein bei 230° siedendes Öl von ganz charakteristischem, lange anhaftendem Geruch.

Bemerkungen für die Analyse von Hämin und Hämatin.

Alle Häminpräparate verbrennen im offenen Rohr beim Überleiten von Sauerstoff vollständig, neben der Kupferspirale lege man noch eine Silberspirale vor, doch verkürze man hierdurch die Schicht des Kupferoxyds möglichst wenig. Hämatin verbrennt schwieriger: es muß für die Analyse vor allen Dingen aufs feinste gepulvert sein und dann wird es am besten mit Kupferoxyd gemischt verbrannt. Man kann aber auch im Schiffchen im Sauerstoffstrome verbrennen, dann muß dies aber rasch geschehen, so daß sich entwickelndes Kohlenoxyd mit Flamme verbrennt. Als Absorptionsmittel für das Kohlendioxyd diene Natronkalk.

Das im Schiffchen zurückbleibende Eisenoxyd kann meist zu einer Eisenbestimmung verwendet werden, man löse es dazu in Salzsäure auf und fälle mit Ammoniak, es ist nämlich nicht ausgeschlossen, daß als Verbrennungsrückstand wenigstens teilweise Fe_3O_4 erscheint, wodurch sich ein zu niedriger Eisengehalt berechnet, wenn dies unter der Annahme, die Asche bestehe aus Fe_2O_3, geschieht.

Die Stickstoffbestimmung nach *Dumas* erfordert ziemlich langes und heftiges Glühen, man sorge also für recht schwer schmelzbare Verbrennungsröhren: nach *Kjeldahls* Methode werden nur dann richtige Werte erhalten, wenn zum Zerstören von je 0·1 *g* Substanz 10 cm^3 rauchende Schwefelsäure unter Zusatz eines Körnchens Kupferoxyd verwendet wurden und das Erhitzen mindestens 24 Stunden dauerte.

Zur Zerstörung der Hämine durch Salpetersäure bei Cariusbestimmungen, die hier jeder anderen Art vorzuziehen sind, genügt 5stündiges Erhitzen auf 130°, natürlich läßt sich im Filtrat vom Chlorsilber auch noch das Eisen bestimmen.

Gallenfarbstoffe und Abbauprodukte.

Von **William Küster**, Stuttgart.

A. Die Aufarbeitung von Gallensteinen.

Bei der Darstellung von Gallenfarbstoffen erweist es sich als nützlich, die als Lösungsmittel dienenden Flüssigkeiten, wie Alkohol, Eisessig, Chloroform, in einem sehr großen Überschuß anzuwenden: eine glatte Filtration gelingt in den meisten Fällen nur bei Beobachtung dieser Vorsichtsmaßregel, aus dem Filtrat wird dann zunächst das Lösungsmittel bis auf einen geringen Rest abdestilliert.

Zur Gewinnung von Gallenfarbstoffen[1]) eignen sich am besten Gallensteine aus der Gallenblase des Rindes, die immerhin häufig vorkommen und meist in reichlicher Menge Farbstoff enthalten, während das Cholesterin zurücktritt. Die Farbe solcher Konkremente ist ziegelrot, die Größe derselben wie ihre Gestalt wechselt, am häufigsten erscheinen sie als kugelförmige Gebilde mit konzentrischer Schichtung bis zu 5 *cm* Durchmesser, selten sind vollkommen ausgebildete Tetraeder von fast gleicher Länge der Seitenkante; eine Schichtung ist auch hier zu erkennen.

In den Gallengängen von Pferden können sich ebenfalls Konkremente finden (*W. Küster*[1]), die zum größten Teil aus Farbstoff bestehen, sie sind von geringerem Umfang als die Gallensteine, etwa von Johannisbeer- bis Kirschkerngröße, und tief braun gefärbt.

Auch die Gallensteine, welche sich so häufig in der Gallenblase des Menschen finden und gewöhnlich die Form von Tetraedern besitzen, enthalten Farbstoff, doch tritt die Menge desselben gegenüber dem Cholesterin ganz zurück. *Staedeler*[2]) hat doch seine Untersuchungen mit Hilfe menschlicher Gallensteine ausgeführt und die Formel ($C_{16} H_{18} O_3 N_2$) für das Bilirubin festgestellt, wie sie noch heute angenommen wird, während zuerst *Valen-*

[1]) *William Küster,* Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **26**. S. 314 (1898); Bd. **47**. S. 294 (1906). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 1268 (1902).

[2]) *G. Staedeler,* Über die Farbstoffe der Galle. *Liebigs* Annal. d. Chemie. Bd. **132**. S. 323 (1864).

tiner[1]), dann *Maly*[2]) und *Thudichum*[3]) Rindergallensteine zur Herstellung größerer Mengen dieses Farbstoffs verwandten.

Die Galle selbst auf Farbstoffe zu verarbeiten ist zwar versucht worden, es dürfte aber sehr mühsam sein, größere Mengen derselben daraus herzustellen. Es sei erwähnt, daß *Scherer*[4]) einen Farbstoff aus menschlichem Harn bei Gelbsucht gewonnen hat; doch lag schon nach der Art der Herstellung ein Kunstprodukt vor. Auch aus Blutserum läßt sich Gallenfarbstoff herstellen.

Hier soll nur die Aufarbeitung von Gallensteinen aus der Gallenblase des Rindes behandelt werden.

Die frischen Konkremente (man wähle nur solche, welche nach ihrem Aussehen Farbstoff enthalten, denn es finden sich auch Konkremente, die gar keinen Farbstoff führen), die vom anhängenden Schleim gesäubert worden sind, werden zunächst vorsichtig bei einer 100° nicht übersteigenden Temperatur getrocknet, aufs feinste verrieben und durch ein engmaschiges Sieb getrieben — Arbeiten, die wegen der Auge und Nase reizenden Staubentwicklung und der intensiven Färbekraft der kleinsten Partikelchen mit Vorsichtsmaßregeln, z. B. in möglichst geschlossenen Sieben, auszuführen sind.

1. Je 150 *g* des feinen, getrockneten Pulvers werden dann in eine große Extraktionshülse von Schleicher & Schüll (60 : 180) gebracht und im *Soxhlet*schen Apparate 1 Tag lang mit Äther extrahiert, der neben Cholesterin auch Fette und einen färbenden Stoff hinwegnimmt. Der hierdurch bedingte Verlust beträgt etwa 4%, also ca. 6 *g*.

2. Das entfettete und vom Äther wieder befreite Pulver, noch ca. 144 *g*, wird nun in ein hohes Becherglas gebracht und mit 1 *l* siedenden Wassers übergossen; man schwenkt mehrere Male um und läßt bis zum Absitzen stehen. Die zunächst stark braun gefärbte Lösung wird durch ein dickes Filter (Nr. 591 von Schleicher & Schüll) abgegossen, durch die gleiche Menge heißen Wassers ersetzt und dies Verfahren fortgesetzt, bis nur noch wenig Substanz, hauptsächlich gallensaure Salze, herausgelöst wird, was daran zu erkennen ist, daß das Waschwasser nur noch wenig gefärbt erscheint, worauf die ganze Menge des Pulvers auf das Filter gebracht wird. Der hier entstehende Verlust beträgt etwa 5·4% des noch vorhandenen Pulvers, also ca. 8 *g*, das Gewicht des Restes demnach ca. 136 *g*.

3. Als dritte Operation folgt nun die Zersetzung der in dem Pulver vorliegenden Calcium- und Magnesiumverbindungen der Farbstoffe durch

---

[1]) *Valentiner, Günzburgs* Zeitschr. 1858. S. 46.

[2]) *R. Maly*, Chemische Untersuchungen über die Gallenfarbstoffe. Wiener. Akad. Ber. 2. Abt. Bd. **57**. S. 95 (1868); Bd. **59**. S. 597 (1869). *Liebigs* Annal. d. Chemie. Bd. **132**. S. 127; Bd. **163**. S. 77; Bd. **175**. S. 76; Bd. **181**. S. 106.

[3]) *J. L. W. Thudichum*, Chemische Untersuchungen über die Gallenfarbstoffe. Journ. f. prakt. Chemie. Bd. **104**. S. 196.

[4]) *Scherer*, Zusammensetzung und Eigenschaften des Gallenfarbstoffs. Annal. der Chemie. Bd. **53**. S. 277 (1845).

eine Säure, wodurch auch Phosphate der Erdalkalimetalle in Lösung gehen. Karbonate und Schwefelverbindungen zerlegt werden. Es kann das durch heiße 10%ige Essigsäure am besten bewirkt werden, und zwar in der Weise, daß man die Säure auf das noch in dem Trichter befindliche feuchte Pulver bringt, die Trichterröhre aber so lange verschließt, bis die Wirkung der Säure beendet ist, welches Verfahren wiederholt wird, bis weder $Ca^{\cdot\cdot}$ noch $Mg^{\cdot\cdot}$ im Filtrat erscheint. Der Verlust beträgt hierbei ca. 18%, also 25 *g*, das Gewicht des Restes demnach 111 *g*.

4. Die Essigsäure wird dann durch Wasser verdrängt, die Masse auf Fließpapier später bei einer 100° nicht übersteigenden Temperatur getrocknet, wieder in die schon gebrauchte Hülse gefüllt und aufs neue mit Äther einen Tag lang extrahiert, um Fettsäuren wegzunehmen, die aus Kalkseifen durch die Behandlung mit Essigsäure frei gemacht wurden. Der Äther nimmt hierbei auch ein wenig roten Gallenfarbstoff weg, der sich im Extraktionskolben absetzt und daher leicht wiederzugewinnen ist. Der Verlust beträgt ca. 3·8%, also ca. 4 *g*, der Rest 107 *g*.

5. Letzterer muß nun etwa 8 Tage lang mit immer neuen Mengen 96%igen kalten Alkohols behandelt werden. Man verteilt ihn am besten auf 2 Flaschen von je ½ *l* Inhalt, schüttelt in der Maschine, gießt die anfangs stark grün gefärbte Lösung erst nach vollständiger Klärung durch ein Kreppfilter, destilliert den Alkohol zu $^9/_{10}$ ab und benutzt ihn von neuem zur Extraktion, bis nur noch schwach gefärbte Auszüge erhalten werden. Durch den Alkohol wird also ein grüner Gallenfarbstoff entfernt, dessen Menge nicht unbedeutend erscheint, beträgt doch die Menge des Gelösten ca. 4·5%, doch erweist sich der nach völliger Vertreibung des Alkohols hinterbleibende Rückstand als ein Gemenge, das zum allergrößten Teil aus einer fettigen Substanz besteht, die trotz der vorausgehenden Behandlung mit Äther nicht herausgenommen worden ist. Daher trägt man am besten die konzentrierten alkoholischen Auszüge in Äther ein, wobei nur der Farbstoff gefällt wird, doch muß das Lösen in Alkohol mit der Fällung und die Ausscheidung durch Äther öfters wiederholt werden. Der so gereinigte Farbstoff wird nur in geringer Ausbeute (ca. 1%) erhalten und dürfte auch noch ein Gemisch vorstellen, in dem jedoch das von vornherein vermutete „Biliverdin" enthalten sein dürfte.

6. Sobald der Alkohol nur noch Spuren des grünen Farbstoffs aufnimmt, unterbricht man die Behandlung, bringt das Gallensteinpulver vollständig auf das Filter und trocknet erst auf Fließpapier und dann bei ca. 100°. Der Rest wird etwa 102 *g* betragen. Es folgt nun die Herausnahme des rohen „Choleprasins" durch heißen Eisessig. Zu diesem Zweck verteilt man das noch vorhandene Pulver auf 3 Porzellanschalen, übergießt jede Portion mit 1 *l* kochendem Eisessig und läßt absitzen. Die erkaltete dunkelgrüne Lösung wird wieder durch ein Kreppfilter abgegossen und der Eisessig unter vermindertem Druck bis auf ein Zehntel des Volumens abdestilliert, worauf er von neuem verwendet werden kann, denn die Einwirkung mit Eisessig muß etwa 10mal wiederholt werden, ehe alles Chole-

prasin herausgelöst wird. Bei den späteren Extraktionen kann das Filtrat bis auf ein Zwanzigstel seines Volumens eingeengt werden.

Die nach Abdestillation des Eisessigs verbleibende Lösung wird jedesmal zur Gewinnung des Rohcholeprasins in 1 *l* Wasser, also das 10- bis 20fache Volumen, eingetragen, dem zweckmäßig ein wenig Ammoniak zugesetzt wird, da die Anwesenheit von Ammonsalz die Fällung des Farbstoffs begünstigt. Der auf einem gehärteten Filter gesammelte, sehr voluminöse Schlamm wird säurefrei gewaschen und auf Fließpapier soweit getrocknet, daß er sich abheben läßt.

Nun hat sich gezeigt, daß trotz der voraufgehenden Behandlung mit Alkohol dem rohen Choleprasin ein alkohollöslicher grüner Farbstoff beigemengt ist. Danach hat es den Anschein, daß in den Gallensteinen entweder eine Verbindung beider vorliegt, die erst durch die Behandlung mit Eisessig gelöst wird, oder daß der grüne alkohollösliche Farbstoff in einer Modifikation vorliegt, welche erst durch das Lösen in Eisessig in die alkohollösliche Form übergeht. Wahrscheinlich wirkt außerdem der Eisessig auch auf einen kleinen Teil der Farbstoffe chemisch verändernd ein, und zwar durch Abspaltung von Ammoniak.

Das auf Fließpapier getrocknete Rohcholeprasin im Gewicht von ca. 30 *g*, entsprechend ca. 20 *g* lufttrockener Substanz (die Ausbeute an Rohcholeprasin beträgt ca. 20%, im gegebenen Fall also auch 20 *g*), wird also in einer großen Reibschale mit 96%igem Alkohol angerieben und allmählich in ein hohes Becherglas übergespült, so daß die Menge des Alkohols 1 *l* beträgt. Man läßt völlig absitzen, gießt die Lösung durch ein Kreppfilter ab und wiederholt die Behandlung mit Alkohol, bis er sich nur noch ganz schwach anfärbt. Man kann natürlich auch in der Maschine schütteln und verfährt dann wie bei 5. angegeben ist.

a) Aus den Filtraten wird der Alkohol zum größten Teil abdestilliert (der erste Auszug vielleicht bis auf 50 cm^3, die späteren können noch stärker konzentriert werden) und die konzentrierten Lösungen in die 10- bis 20fache Menge Wasser, die wenige Tropfen verdünnte Schwefelsäure enthält, eingetragen, worauf der Farbstoff ausfällt und durch Filtration abgetrennt werden kann. Die Filtrate sind immer schwach gefärbt und enthalten geringe Mengen augenscheinlich zersetzten Farbstoffs. Ausbeute: 5—6 *g*. Er ist amorph, wahrscheinlich liegt also ein Gemenge vor, in dem aber das vermutete Biliverdin, $C_{16}H_{18}O_4N_2$, sich nicht befinden dürfte. Jedenfalls gehören aber diese in Alkohol und in Essigsäure löslichen grünen Substanzen, welche durch Oxydationsmittel eine Reihe von Farben geben, zur Kategorie des Biliverdins und so mag der neben dem Choleprasin auftretende Körper einstweilen als β-Biliverdin unterschieden werden. Er hat saure Natur und löst sich in jedem Alkali auf.

b) Der in Alkohol nicht lösliche Teil des rohen Choleprasins dürfte auch noch ein Gemenge vorstellen, das als gereinigtes Choleprasin bezeichnet werden mag; es stellt amorphe, spröde, fast schwarze, glasglänzende Stücke dar. In chemischer Beziehung unterscheidet es sich durch seinen, wenn

auch geringen Schwefelgehalt von den übrigen Gallenfarbstoffen und zeigt hierdurch seine Abstammung aus dem Eiweiß. Choleprasin besitzt also eine andere Konstitution als das Bilirubin und seine Abkömmlinge und gibt z. B. bei der Oxydation keine Hämatinsäure.

7. Aus dem auch mit Eisessig erschöpfend behandelten Gallensteinpulver — seine Menge wird noch über 50% des in Arbeit genommenen Pulvers betragen — wird nun die Essigsäure allmählich durch Wasser, dieses durch Alkohol verdrängt; nachdem dann auf Fließpapier, schließlich bei 60° getrocknet worden ist, folgt eine dritte Extraktion mit Äther, wodurch abermals ein kleiner Verlust von ca. 0·8% eintritt, und

8. eine abermalige Behandlung mit kaltem Alkohol in derselben Weise wie im 5. Abschnitt angegeben wurde, wobei ca. 1·4% des Pulvers noch herausgelöst werden.

9. Jetzt wird zur Extraktion mit Chloroform geschritten, die im *Soxhlet*schen Apparat, am besten vor Licht geschützt, vorgenommen wird. Man verwendet die bei den Ätherextraktionen benutzte Hülse, welche nunmehr durch die noch vorhandene Menge des Pulvers (ca. 80 *g*) vielleicht nur zur Hälfte gefüllt wird, was aber zweckentsprechend ist, weil das Chloroform als spezifisch schwererer Körper das Pulver in die Höhe hebt. Auch muß die Hülse so gestellt sein, daß ihr Rand mehrere Zentimeter über die obere Biegung des Ablaufrohres hinausreicht, da sonst das Gallensteinpulver leicht mit fortgerissen wird. Die Dauer der Extraktion richtet sich natürlich nach der Menge des vorhandenen roten Farbstoffs, sie wird ca. 8 Tage in Anspruch nehmen und jedenfalls so lange fortgesetzt, bis das ablaufende Chloroform nur noch ganz schwach gefärbt ist. Danach hat sich im Extraktionskolben ein Teil des Bilirubins in festen, dunkelbraunroten Krusten abgesetzt (Fraktion I), die darüber stehende Lösung ist tief gefärbt und liefert neue Mengen des Farbstoffs beim Stehen, nachdem sie auf ein Viertel des Volumens durch Abdestillation des Chloroforms konzentriert worden ist (Fraktion II). Aus dem Filtrat von dieser Ausscheidung kann endlich auf Zusatz von Alkohol eine dritte Fraktion eines roten Farbstoffs erhalten werden, während die auch hiervon filtrierte Lösung immer noch stark gefärbt ist; es stecken schwarzgrüne, harzige Substanzen unbekannter Natur darin.

Was die Ausbeuten betrifft, so wird Fraktion I ungefähr 10—15% des zur Extraktion gelangenden Pulvers, Fraktion II 4—5%, Fraktion III 1—2% betragen, das sind, wenn von 80 *g* ausgegangen worden ist, zirka 10 resp. 3·5 resp. 1·5 *g*, und von diesen Mengen erweist sich nur Fraktion I und II als ein schon ziemlich reines Bilirubin, während die dritte Fraktion ein chlorhaltiges Bilirubin vorstellt, das unter der Einwirkung des extrahierenden Chloroforms entstanden ist. Natürlich ist es nicht ausgeschlossen, daß man auch einmal höhere Ausbeuten an Bilirubin bekommt. Jedenfalls lohnt es sich, die nach der erschöpfenden Behandlung mit Chloroform noch übrige Menge des Pulvers (60 *g*) erneut mit 10%iger Essigsäure zu behandeln, worauf dann Chloroform wiederum nicht unbeträchtliche Mengen

des roten Farbstoffs extrahiert. und zwar erhält man alle drei Fraktionen in Mengen, deren Gewicht je noch die Hälfte der bei der ersten Extraktion erübrigten beträgt. Auch nach einer nun folgenden dritten Behandlung mit 10%iger Essigsäure geht dann von neuem Bilirubin durch Chloroform in Lösung. noch mehr wird davon erhalten. wenn das ganze von Punkt 6 bis 8 angegebene Verfahren wiederholt wird, wobei dann auch weitere Mengen von Choleprasin gewonnen werden. Denn von dem ursprünglich in Arbeit genommenen Pulver (150 *g*) ist sicherlich nach all den beschriebenen Operationen noch ein Drittel übrig. in dem noch reichlich Farbstoff steckt. wovon man sich leicht durch Behandlung einer Probe mit warmer Natriumkarbonatlösung. die allmählich die Farbstoffe löst. überzeugen kann. Auch ist immer noch dasselbe Gemisch von Choleprasin und Bilirubin der Hauptsache nach vorhanden. und es kann durch fortgesetzte Behandlung mit all den angegebenen Agentien gelingen. die Farbstoffe herauszuschälen. allerdings. ehe die restlose Aufarbeitung vollendet ist. kann ein Jahr vergangen sein. Durch die Einwirkung von Alkali geht die Aufschließung zwar rascher vonstatten. doch wird dabei ein Teil der Farbstoffe zersetzt.

B. Das Umkristallisieren des Rohbilirubins.

Wie soeben erwähnt bestehen die Fraktionen I und II des Rohbilirubins bereits aus fast reinem Farbstoff. nur ist derselbe nicht deutlich kristallinisch. Gut ausgebildete Kristalle werden erst beim Umkristallisieren des Bilirubins aus siedendem Dimethylanilin erhalten. wobei allerdings ein Teil des Farbstoffs eine Zersetzung erleidet.

Das Verfahren gestaltet sich wie folgt:

Je 3 *g* bei 110° getrocknetes, fein gepulvertes Rohbilirubin werden in 93 *g* (1 Teil Bilirubin löst sich etwa in 31 Teilen siedenden Dimethylanilins; bei Zimmertemperatur ist das Verhältnis etwa 1 : 112·6) auf dem Babo zum Sieden erhitztes Dimethylanilin (es empfiehlt sich, das käufliche Dimethylanilin gut zu trocknen) eingetragen. worauf noch 5 Minuten im Sieden erhalten wird. dann wird siedend heiß filtriert. Die Filter Nr. 597 von Schleicher & Schüll eignen sich gut, für jede Portion von 3 *g* muß ein besonderes Filter genommen werden. Aus dem Filtrat haben sich nach mehrtägigem Stehen Kristalle abgesetzt (Fraktion I). die abfiltriert und mit kaltem Dimethylanilin nachgewaschen werden, bis der Ablauf durch Alkohol nicht mehr getrübt wird. Aus dem gesamten Filtrat wird dann unter vermindertem Druck das Dimethylanilin bis auf $^1/_6$ der vorhandenen Menge abdestilliert, worauf nach 2—3tägigem Stehen eine zweite Kristallisation (Fraktion II) erfolgt, die, wie bei der ersten angegeben, getrennt und gereinigt wird. Das Filtrat von Fraktion II wird dann in die achtfache Menge absoluten Alkohols eingetragen, der entstandene Niederschlag (Fraktion III) nach eintägigem Stehen filtriert, vom Filtrat der Alkohol abdestilliert und der Rückstand durch verdünnte Salzsäure gefällt (Fraktion IV).

Die vom siedenden Dimethylanilin bei der ersten Einwirkung nicht gelösten Anteile werden zweckmäßig noch ein zweites Mal mit dem Lösungsmittel behandelt, und zwar nimmt man für die Rückstände aus 2 Portionen wieder 93 *g*; was dann noch nicht gelöst wurde, gibt bei einer 2. Wiederholung des Verfahrens immer noch weitere Mengen von kristallisiertem Bilirubin. Die Ausbeuten an letzterem, also an den Fraktionen I und II zusammengenommen, stellen sich dann auf etwa $^2/_3$ des in Arbeit genommenen Rohbilirubins, wovon $^7/_8$ auf Fraktion I kommen; Fraktion III ist undeutlich kristallisiert und stellt schon ein Zersetzungsprodukt des Bilirubins vor, das letztere gilt auch für Fraktion IV und für den Anteil, der sich auch nach 3maliger Behandlung mit Dimethylanilin nicht gelöst hat.

C. Eigenschaften des Bilirubins.

Nachdem das umkristallisierte Bilirubin vom anhängenden Dimethylanilin befreit worden ist, was durch langes Schütteln mit kaltem Alkohol allmählich gelingt, gibt es bei der Analyse Werte, die zur Aufstellung der Formel $(C_{16}H_{18}O_3N_2)x$. (das Molekulargewicht hat direkt noch nicht festgestellt werden können, *Orndorff* und *Teeple*[1]) schließen aus dem Bestehen eines Monoazoprodukts $(C_{32}H_{35}O_6N_4)N_2R$ auf die verdoppelte Formel) berechtigen.

Bilirubin kristallisiert aus heißem Dimethylanilin meist in großen breiten rhombischen Säulen, es können aber auch langgestreckte Nadeln (namentlich in Fraktion II) und andere Formen auftreten. Seiner chemischen Natur nach verhält es sich wie eine Säure (auf 16 C-Atome ist 1 vertretbares Wasserstoffatom vorhanden *R. Köster*[2]), es bildet also mit Basen Salze, von denen die der Alkalien in Wasser löslich sind.

Basische Eigenschaften besitzt das Bilirubin nicht; durch Eisessig wird es nicht verändert, wohl aber durch konzentrierte Salzsäure, die in der Hitze Stickstoff herausnimmt, und durch konzentrierte Schwefelsäure, deren Einwirkung vielleicht zur Bildung einer Sulfonsäure führt.

Bilirubin ist ein sehr leicht veränderlicher Körper; schon beim Aufbewahren in trockenem Zustande tritt eine Umwandlung ein, die von einer Änderung der Farbe begleitet ist. Die anfänglich schön braunrote Farbe bekommt einen gelbbraunen Ton, solche Präparate pflegen an Eisessig etwas grünen Farbstoff abzugeben — es dürfte also eine Oxydation an der Oberfläche eingetreten sein —, außerdem zeigt sich die Löslichkeit in Chloroform ganz beträchtlich vermindert. 1 Gewichtsteil eines frisch umkristallisierten Bilirubins löst sich nämlich schon in etwa 120 Gewichts-

[1]) *W. R. Orndorff* und *J. E. Teeple*, On Bilirubin, the red coloring matter of the bile. Americ. Chem. Journ. Vol. 26. p. 86 (1901); Vol. 33, p. 215 (1905). — Dieselben, Beiträge zur wissenschaftlichen Medizin und Chemie. *Salkowski*, Festschrift 1904. S. 301.

[2]) *R. Köster*, Kritische und experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe. Inaug.-Dissert. Rostock 1901.

teilen Chloroform auf, schon nach 6 Wochen sind über 300 Teile erforderlich und nach einem Jahre etwa ist ein Bilirubin entstanden, das sich im Verhältnis von etwa 1 : 800 in Chloroform löst. Dementsprechend verhält sich auch bereits das „Bilirubin“ der Gallensteine, ein Teil desselben wird leicht durch Chloroform gelöst und ist von dunkelroter Farbe, die Teile aber, welche nach z. B. 6tägiger Extraktion am 7. Tage herausgelöst werden, sind orange gefärbt und zeigen eine Löslichkeit im Verhältnis von etwa 1 : 1100. Beide Formen des Bilirubins haben aber die gleiche prozentische Zusammensetzung. Worin die Veränderung besteht, welche das Bilirubin erleidet, ist noch nicht sicher bekannt, man kann daran denken, daß sich der Farbstoff polymerisiert und daß andrerseits beim Umkristallisieren aus siedendem Dimethylanilin (Temperatur 192°) wieder eine Depolymerisation eintritt.

Viel rascher vollzieht sich die Oxydation des Bilirubins durch den Sauerstoff der Luft, wenn es sich in Lösung befindet. Beim Verdampfen einer Lösung von Bilirubin in Chloroform wird immer namentlich am Licht ein Teil des roten Farbstoffes in einen grünen verwandelt, der sich in Eisessig löst. Wahrscheinlich handelt es sich aber auch hier bereits um ein Gemisch, da sich zersetzendes Chloroform wie Chlor wirken dürfte und durch *Thudichum* zuerst nachgewiesen wurde, daß Halogene auf Bilirubin substituierend wirken. Hat man es aber mit einer wässerigen Lösung des Bilirubins in einem Alkali zu tun, so dürfte neben der Oxydation eine Hydrolyse des Bilirubins eintreten, so daß dann auch hier ein Gemenge von grünen Farbstoffen entsteht, die zur Kategorie des Biliverdins gehören. Unter ganz besonderen Bedingungen kann es allerdings auch einmal gelingen, einen Körper zu erhalten, der bei der Analyse mit der Formel $C_{16}H_{18}O_4N_2$ übereinstimmende Werte gibt. Kristallisiert konnte dieses Oxydationsprodukt des Bilirubins bisher aber nicht erhalten werden, und es ist daher nicht sicher, ob nicht doch ein Gemenge vorliegt.

Will man „Biliverdin“ aus Bilirubin darstellen, so verfahre man nach allem wie folgt:

1 *g* Bilirubin wird in 35 cm^3 $^1/_{10}$ n-KOH (das entspricht für die Formel $C_{16}H_{18}O_3N_2$ 1 Molekel KOH) unter Zusatz von $^1/_2$ *l* Wasser zur Lösung gebracht, die Lösung filtriert und das Filtrat in einer großen Schale drei Wochen der Einwirkung des Luftsauerstoffs ausgesetzt, dabei darf aber die Temperatur nicht über 5° C steigen.

Die grün gewordene Lösung wird dann durch einen geringen Überschuß von Salzsäure (es genügten schon 34·5 cm^3 $^1/_{10}$ N. HCl, ein geringer Überschuß bewirkt aber besseres Absetzen des Niederschlages) gefällt, der Niederschlag filtriert, ausgewaschen und noch feucht in einem Überschuß von Alkohol gelöst. Wenn die Oxydation vollständig geworden ist und sich nur „Biliverdin“ gebildet hat, wird völlige Lösung erfolgen. Man filtriere, dampfe den größten Teil des Alkohols unter vermindertem Druck ab und gieße den Rückstand in Wasser, wobei das Biliverdin ausfällt und dann gesammelt werden kann. (Ausbeute fast 1 *g*.)

Jeder Überschuß an Alkali und jede Temperaturerhöhung bedingt einen anderen Verlauf der Reaktion, sichtbar z. B. daran, daß das saure Filtrat vom Biliverdin deutlich gefärbt ist und Ammoniumsalz enthält. Wirkt ein Überschuß auch nur von Alkalikarbonat bei 10° auf Bilirubin drei Wochen ein, so wird die Ausbeute an grünem Farbstoff vielleicht nur noch 50% vom verwendeten Bilirubin betragen, auch ist es sicher ein Gemenge mehrerer Substanzen, daneben hat sich ein wasserlöslicher Körper von brauner Farbe gebildet, der die sogenannte Pyrrolreaktion (beim Erhitzen der Substanz [ohne Zinkstaub] treten Dämpfe auf, die einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan intensiv röten) außerordentlich stark gibt. Zu seiner Darstellung macht man das Filtrat vom angeblichen Biliverdin wieder alkalisch, engt es stark ein und fällt nun mit einer Säure aus. Ein Mittel, den Körper zu reinigen, ist noch nicht bekannt. Das Filtrat gibt alsdann an Äther verschiedene Körper ab, deren Trennung aber ebenfalls noch nicht gelungen ist.

Es zerfällt also das Bilirubinmolekül unter dem Einfluß von Alkalien außerordentlich leicht, wobei eine Mitwirkung des Luftsauerstoffs allerdings noch nötig ist. Setzt man daher zu der alkalischen Lösung des Bilirubins ein Oxydationsmittel, so tritt die Umwandlung noch rascher ein und jetzt befinden sich reichliche Mengen von Hämatinsäuren unter den entstehenden Produkten.

10 *g* Rohbilirubin werden z. B. in 200 *g* 5%iger Natronlauge gelöst und 2 *g* Natriumsuperoxyd in die Lösung eingetragen, worauf 60 Stunden im siedenden Wasserbade erwärmt wird. Die Zersetzung des Farbstoffes vollzieht sich hierbei unter Ammoniakentwicklung, dessen Menge etwa einem Atom Stickstoff, auf das Molekül $C_{32}H_{36}O_6N_4$ bezogen, entspricht.

Die alkalische Lösung wird nun mit Schwefelsäure angesäuert, wobei reichliche Mengen von Kohlendioxyd entweichen, und mit Wasserdämpfen die flüchtigen sauren Zersetzungsprodukte, unter denen sich Essigsäure und wahrscheinlich auch Ameisensäure befinden, abgeblasen. Jetzt kann mit Äther die Roh-Hämatinsäure entzogen werden, deren Trennung in Anteile, die schwerer in Äther löslich sind, z. B. Bernsteinsäure, und in reine Hämatinsäuren nach dem auf S. 630 und 631 besprochenen Verfahren leicht bewerkstelligt werden kann, doch erhält man nur etwa 2 *g* reine Hämatinsäure $C_8H_8O_5$.

Da die angewandten 2 *g* Natriumsuperoxyd nur etwa einem Atom Sauerstoff auf das Molekül $C_{16}H_{18}O_3N_2$ entsprechen, so dürfte die Zersetzung des Bilirubins hauptsächlich durch das Alkali erfolgen. Durch dieses Verhalten unterscheidet sich der rote Gallenstoff scharf vom Hämatin, das in alkalischer Lösung einige Atome Sauerstoff pro Molekül aufzunehmen vermag ohne eine Zerlegung zu erfahren.

Durch Oxydation von Biliverdin in eisessigsaurer Lösung mit Chromsäure wird ebenfalls Hämatinsäure gebildet, doch beträgt ihre Menge im besten Fall 40% vom verwendeten Gallenfarbstoff. Durch Reduktion in

alkalischer Lösung durch Natriumamalgam geht Bilirubin nach *R. Maly*[1] in das „Hydrobilirubin $C_{32}H_{40}O_7N_4$" über, das er für identisch mit *Jaffés* Urobilin hielt. Man suspendiert Bilirubin in Wasser und versetzt mit Natriumamalgam, worauf sich der Farbstoff löst und zugleich reduziert wird, was am Eintreten einer helleren Farbe zu beobachten ist. Nach 2—4 Tagen, während welcher Zeit man häufig schüttelt und zuletzt im Wasserbade erwärmt, ist die Reduktion vollendet, worauf die vom Quecksilber abgegossene Lösung durch Salz- oder Essigsäure gefällt wird. Hierbei tritt dunkelgranatrote Färbung ein und der Farbstoff fällt allmählich in dunkelrotbraunen Flocken aus. Das Hydrobilirubin ist noch nicht kristallisiert erhalten worden, es löst sich in Alkohol, Chloroform, Eisessig. Die alkalischen Lösungen des Farbstoffs sehen gelb aus, sauer reagierende dagegen rot auch zeigen letztere einen deutlichen Absorptionsstreifen, während ammoniakalische einen solchen erst auf Zusatz von etwas Zinksulfatlösung hervortreten lassen; zugleich tritt grüne Fluoreszenz der im durchgehenden Lichte granat- bis rosenroten Lösung ein.

---

[1]) *R. Maly*, Über die Umwandlung von Bilirubin in Harnfarbstoff. *Liebigs* Annal. d. Chem. Bd. **163**. S. 77.

Darstellung der Gallensäuren und ihrer wichtigsten Abbauprodukte und ihr Nachweis.

Von **Olof Hammarsten**, Upsala.

I. Darstellung der gepaarten Gallensäuren.

A. Darstellung der Glykocholsäuren.

a) Glykochol- und Glykocholeinsäure.

Als Rohmaterial dient am besten die Rindergalle, die man indessen erst mit Alkohol von dem sog. Schleime befreit. Wenn man zur Ausfällung der Glykocholsäuren die schleimhaltige Galle direkt mit einer Säure versetzt, so wird nämlich immer das Nukleoalbumin (der sog. Schleim) gefällt, und infolge der eiweißfällenden Eigenschaft der Taurocholsäure wird die letztere zum Teil mit ausgefällt und kann durch Zersetzung unter Cholalsäurebildung während der fortgesetzten Arbeit die Reindarstellung der Glykocholsäuren erschweren. Von der schleimfreien, von Alkohol befreiten Galle bereitet man eine wässerige Lösung, die nicht mehr als 3% gallensaure Salze enthält.

Wenn eine kleinere Portion dieser Lösung, mit Äther und Salzsäure (bis zu 2%) versetzt, sogleich getrübt wird und innerhalb 12 Stunden reichliche Mengen von Kristallen oder einen mit harziger Masse gemengten Kristallbrei abgesetzt hat, so ist die Lösung direkt zur Darstellung der Glykocholsäure geeignet, und man verfährt in dem Falle, wie unten angegeben wird. Wenn dagegen die Probe klar bleibt oder nur opalisierend wird, so bedeutet dies, daß die Galle verhältnismäßig reich an Taurocholsäure, welche die Ausfällung der Glykocholsäuren verhindert, ist. In diesem Falle kann man allerdings zum Ziele kommen, wenn man nach dem älteren Verfahren von *Strecker*[1]) eine größere Menge Säure zusetzt, bis eine bleibende Trübung entsteht; aber hierbei kann infolge der Einwirkung der Säure allmählich eine Abspaltung von Cholalsäure aus der Taurocholsäure stattfinden, und es ist deshalb besser, erst eine glykocholsäurereichere Fraktion aus der Galle darzustellen.

---

[1]) *Adolph Strecker*, Untersuchung der Ochsengalle. Erste Abhandlung. Annalen der Chemie und Pharmazie, herausgegeben von *Friedrich Wöhler* und *Justus Liebig*. Bd. 65. S. 1—37. Heidelberg 1848.

Zu diesem Zwecke fällt man die oben genannte Lösung mit Bleizuckerlösung oder mit einer 5%igen Lösung von Eisenchlorid, trennt den Niederschlag durch Filtration oder Zentrifugieren von der Flüssigkeit, zerlegt ihn in der Wärme mit Natriumkarbonat in Wasser, filtriert und verdunstet fast zur Trockene. Der Rückstand wird in Alkohol gelöst, von dem Natriumkarbonate abfiltriert, von neuem eingetrocknet und in Wasser (zu einer 2–3%igen Lösung) gelöst. Diese Lösung ist nun zur Ausfällung der Glykocholsäuren fertig.

Die Menge und Zusammensetzung der obigen Blei- bzw. Eisenfällung wechselt selbstverständlich mit der Beschaffenheit der verarbeiteten Galle, und trotzdem das reine Taurocholat nicht von den genannten Reagenzien gefällt wird, enthält sowohl die Blei- wie die Eisenfällung immer ein Gemenge von Glyko- und Taurocholaten. Der Bleiniederschlag enthält oft 60—70% Glykocholsäure, während die Eisenfällung selten mehr als 50% von ihr enthält. Es ist in der Regel auch leichter, eine reichliche Kristallisation von Glykocholsäuren zu erhalten, wenn man von der Bleizuckerfällung, als wenn man von der Eisenfällung ausgeht. Aus dem Grunde ist auch im allgemeinen die Fällung mit Bleizucker vorzuziehen, wenn auch die Eisenfällung regelmäßig einen viel größeren Bruchteil der gesamten Gallensäuren enthält.

Zur Ausfällung der zwei Glykocholsäuren wird nun die oben genannte, direkt (aus der Galle) oder indirekt (aus der Blei- bzw. Eisenfällung) erhaltene, höchstens 3%ige Lösung von gallensauren Salzen in einem passenden, mit Stöpsel versehenen Glasgefäße mit soviel Äther versetzt, daß nach Sättigung damit eine wenigstens zentimeterhohe Ätherschicht über die Flüssigkeit stehen bleibt. Man setzt nun Salzsäure bis zu 2% hinzu, schüttelt tüchtig um und läßt in einem kühlen Zimmer stehen. Die Kristallisation fängt regelmäßig schon nach kurzer Zeit an und ist meistens in weniger als 24 Stunden beendet. Die gefärbte Ätherschicht, welche Fettsäuren enthält, wird entfernt, die Kristallmasse geschüttelt, abgesogen, in Wasser verteilt, von neuem abgesogen, mit Wasser nachgewaschen und stark ausgepreßt. Diese Masse stellt ein Gemenge von überwiegend kristallisierter Glykocholsäure mit amorpher, harziger Glykocholeinsäure dar.

Die Glykocholsäure, $C_{26}H_{43}NO_6$, gewinnt man in folgender Weise aus diesem Gemenge. Man verteilt die Masse fein in Wasser (1:100), erhitzt zum Sieden und filtriert siedendheiß im Heißtrichter. Die Hauptmenge der Glykocholsäure geht hierbei in Lösung und scheidet sich aus dem Filtrate als eine Masse von langen, fast farblosen Nadeln aus. Aus dem in dem Kolben und auf dem Filter gebliebenen Rückstande, welcher aus Glykocholeinsäure, Paraglykocholsäure, etwas Glykocholsäure und Farbstoff besteht, kann durch neues Auskochen mit Wasser noch etwas Glykocholsäure gewonnen werden. Sämtliche so gewonnene Säure soll nun aus heißem Wasser umkristallisiert werden; aber hierbei bleibt immer ein Teil ungelöst, der abfiltriert wird. Die nun aus dem Filtrate umkristallisierte Säure ist regelmäßig schneeweiß und anscheinend rein. Versucht man aber dieselbe in heißem Wasser zu lösen, so gelingt dies regelmäßig nicht vollständig, selbst dann nicht, wenn man eine größere Menge Wasser als die, aus welcher sie auskristallisiert hatte, verwendet, und dieses Verhalten kann bei erneuerten Umkristallisationen sich wiederholen.

Der Grund hierzu ist nicht ganz klar. Nach *Strecker*[1]) soll die partielle Unlöslichkeit durch die Entstehung von Paraglykocholsäure bedingt sein; aber diese Frage scheint einer weiteren Prüfung bedürftig zu sein. Jedenfalls erschwert dieser Umstand in hohem Grade die Reindarstellung der Säure durch Umkristallisieren aus Wasser, und es ist darum besser, die zweimal aus Wasser kristallisierte, ganz trockene, vorher mit Äther extrahierte Säure in Alkohol (1:10) zu lösen und diese Lösung mit Wasser bis zur bleibenden Trübung zu verdünnen. Die Säure kristallisiert leicht und kann in dieser Weise, wenn nötig, durch nochmaliges Umkristallisieren rein erhalten werden.

Aus der schleimfreien Menschengalle kann die Glykocholsäure gewöhnlich direkt, ohne vorherige Fällung mit Bleizucker, durch Äther und Salzsäurezusatz gewonnen werden.

Dieses Verfahren, insoferne als es für glykocholsäurereiche Gallen direkt paßt, rührt von *Hüfner*[2]) her. Ein abgekürztes Verfahren zur Gewinnung dieser Säure aus dem Bleizuckerniederschlage hat *Strecker*[1]) angegeben. Es besteht darin, daß man den Niederschlag mit Alkohol auskocht, siedend heiß filtriert und mit Schwefelwasserstoff das Filtrat entbleit. Durch Verdünnung des Alkohols mit Wasser wird die Säure in Kristallen erhalten. *v. Gorup-Besanez*[3]) hat ein anderes abgekürztes Verfahren angegeben, dessen Prinzip darin besteht, daß man aus der Galle die Farbstoffe mit Kalkmilch fällt und dann mit Schwefelsäure bis zur bleibenden Trübung versetzt. Endlich ist eine Methode, welche auf der Ausfällung der Farbstoffe mit Uranacetat und darauffolgender Fällung mit Eisenchlorid beruht, von *M. Bleibtreu*[4]) angegeben und von *H. Bontemps*[5]) weiter ausgearbeitet worden.

Eigenschaften. Die Glykocholsäure kristallisiert in feinen Nadeln. Nach *Emich*[6]) löst sie sich in kaltem Wasser in dem Verhältnisse 0·33:1000 und in siedendem in dem Verhältnisse 8·3:1000. Leicht löslich in starkem Alkohol, nur sehr wenig löslich in Äther, Chloroform und Benzol. Geschmack süßlich bitter. Die Salze mit Alkalien und alkalischen Erden sind in Wasser leicht löslich; von Salzen der Schwermetalle werden diese Lösungen gefällt. Die Säure und ihre Salze sind rechtsdrehend. Nach *Hoppe-Seyler*[7]) ist für

---

[1]) *Adolph Strecker*, Untersuchung der Ochsengalle. Erste Abhandlung. Annalen der Chemie und Pharmazie, herausgegeben von *Friedrich Wöhler* und *Justus Liebig*. Bd. **65**. S. 1—37. Heidelberg 1848.

[2]) *Gustav Hüfner*, Schnelle Darstellung von Glykocholsäure. Journ. f. prakt. Chem. Bd. **118** (N. F. Bd. **10**). S. 267—268. Leipzig 1874.

[3]) *E. v. Gorup-Besanez*, Eine vorteilhafte Darstellungsweise der Glykocholsäure. Annalen der Chemie u. Pharmazie, herausgegeben von *Friedrich Wöhler* und *Justus Liebig*. Bd. **157** (N. R. Bd. **81**). S. 286—287. Leipzig und Heidelberg 1871.

[4]) *Max Bleibtreu*, Vorläufige Mitteilung über eine neue Methode zur Darstellung der Glykocholsäure aus Rindergalle. Arch. f. d. ges. Physiologie. Von *E. Pflüger*. Bd. **99**. S. 187—190. Bonn 1903.

[5]) *Hans Bontemps*, Beiträge zur Darstellung der Glykocholsäure aus Rindergalle nebst Beobachtungen über die fällende Wirkung der Uransalze auf Gallensäuren. Inaug.-Dissert. Greifswald 1905. S. 1—38.

[6]) *Friedrich Emich*, Über das Verhalten der Rindergalle zu der *Hüfner*schen Reaktion und einige Eigenschaften der Glykocholsäure. Monatshefte f. Chemie. Bd. **3**. Jg. 1882. S. 325—342. Wien 1883.

[7]) *F. Hoppe-Seyler*, Über die Zirkumpolarisationsverhältnisse der Gallensäuren und ihrer Zersetzungsprodukte. Journ. f. prakt. Chemie. Bd. **89**. S. 257—281. Leipzig 1863.

das Natriumsalz, unabhängig von der Konzentration, in alkoholischer Lösung $(\alpha) D = + 25{\cdot}7^0$ und für die wässerige Lösung $+ 20{\cdot}8^0$. Die aus Wasser kristallisierte Säure hat keinen scharfen Schmelzpunkt (*Bondi* und *Müller*). Schmelzpunkt nach *Emich*[1]) 132—134°, nach *Medwedew*[2]) 138 bis 140°, nach *Bondi* und *Müller*[3]) 152° (erweicht bei 133°). Die mehrmals aus Alkohol durch Wasserzusatz kristallisierte Säure zeigte ein konstantes Verhalten (Verf.). Nach dem Trocknen bei 100—105° sinterte sie bei 125—127°, je nach der Geschwindigkeit des Erhitzens, und schmolz unter Aufblähen bei 126—128° zu einer beim Erkalten glasigen Masse.

Die Glykocholeinsäure, $C_{26}H_{43}NO_5$, stellt man nach folgendem, im wesentlichen von *Wahlgren*[4]), dem Entdecker dieser Säure, angegebenem Verfahren her. Die oben (siehe S. 646) erwähnten, nach der Glykocholsäuredarstellung zurückgebliebenen, aus Glykocholeinsäure, Paraglykocholsäure und ein wenig Glykocholsäure nebst viel Farbstoff bestehenden Reste löst man in Wasser mit Hilfe von Natriumkarbonat, filtriert, trocknet ein, extrahiert den Rückstand mit Alkohol, filtriert von dem Karbonate, verdunstet den Alkohol und löst in Wasser. Dieser Lösung setzt man eine 15—20%ige Lösung von Chlorbaryum hinzu, bis die erst verschwindende Trübung bleibend wird und der Niederschlag sich nicht merkbar vermehrt. Wenn nach 24 Stunden die klare oder fast klare Flüssigkeit nicht mehr von Chlorbaryum gefällt wird, filtriert man von dem Niederschlage ab (aus dem Filtrate kann man mit Salzsäure und Äther ein, meistens kristallisierendes Gemenge der zwei Glykocholsäuren erhalten, das zusammen mit anderen ähnlichen Portionen nach dem für Glykocholsäure angegebenen Verfahren verarbeitet werden kann).

Die Baryumsalzfällung wird zur Trennung des Glykocholeinates von Baryumseifen mit Wasser ausgekocht und die Filtrate mit Salzsäure gefällt. Die Fällung, welche regelmäßig noch recht viel Glykocholsäure enthält, wird von neuem mit Natriumkarbonat in das Alkalisalz übergeführt und die Lösung mit Tierkohle entfärbt. Nach dem Eintrocknen wird mit Alkohol extrahiert, das neue Filtrat eingetrocknet und der Rückstand in so viel Wasser gelöst, daß die Lösung höchstens 1% enthält. Die Lösung wird nun mit Äther und Salzsäure bis gegen 1% versetzt, umgeschüttelt und stehen gelassen. Fällt man aus einer mehr konzentrierten Lösung, so scheidet sich die Glykocholeinsäure zu großem Teil als Tropfen aus, die sehr langsam kristallisieren.

Die Kristallmasse wird nach dem Auswaschen mit Wasser mit Wasser gekocht, um verunreinigende Glykocholsäure zu entfernen. Darauf

[1]) *Friedrich Emich,* Über das Verhalten der Rindergalle zu der *Hüfner*schen Reaktion und einige Eigenschaften der Glykocholsäure. Monatshefte f. Chemie. Bd. 3. Jg. 1882. S. 325—342. Wien 1883.

[2]) *An. Medwedew,* Darstellung der Glykocholsäure aus Rindergalle. Zentralbl. f. Physiologie. (Literatur 1900.) Bd. 14. S. 289—291. Leipzig und Wien 1901.

[3]) *S. Bondi* und *Ernst Müller,* Synthese der Glykocholsäure und Taurocholsäure. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 47. S. 499—507. Straßburg 1906.

[4]) *V. Wahlgren,* Über Glykocholsäure. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 36. S. 556—567. Straßburg 1902.

wird sie in Wasser mit etwas Ammoniak gelöst und mit Chlorbaryum gefällt. Das gefällte Baryumsalz wird in das Alkalisalz übergeführt und aus dessen 1%iger Lösung in Wasser die Säure durch Zusatz von Äther und Salzsäure wie oben zur Kristallisation gebracht. Die Glykocholsäure ist so schwer zu entfernen — sei es, daß sie so leicht in Paraglykocholsäure übergeht oder daß sie zusammen mit der Glykocholeinsäure auskristallisiert —, daß man die Umwandlung der Säure in das Baryumsalz 4—5mal wiederholen muß, bevor man in oben angegebener Weise aus dem Alkalisalze eine Kristallmasse von dem konstanten Schmelzpunkte 175—176° erhält. Aus dem Grunde ist auch die Reindarstellung dieser Säure eine sehr beschwerliche, mit großen Verlusten verknüpfte Arbeit und die Ausbeute ist eine kleine.

Die Säure kann aus der konzentrierten, alkoholischen Lösung durch Zusatz von Wasser zu beginnender Trübung umkristallisiert werden.

Eigenschaften. Feine Nadeln oder etwas dickere prismatische Nadeln, die zu Drusen vereinigt sind; auch einzelne kürzere Prismen. Fast unlöslich in kaltem Wasser und sehr schwer löslich, viel weniger löslich als die Glykocholsäure, in heißem. Geschmack stark bitter ohne süßen Nebengeschmack. Leicht löslich in Alkohol; wenig löslich in Äther oder Aceton; fast unlöslich in Benzol und Chloroform. Alkalisalze in Wasser leicht löslich; die Lösungen werden von Salzen der Erdalkalien und der Schwermetalle gefällt. Schmelzpunkt der kristallisierten, bei 100—105° C getrockneten Säure 175—176°.

b) α- und β-Hyoglykocholsäuren.

Neben der von *Gundelach* und *Strecker*[1]) in der Schweinegalle nachgewiesenen Hyoglykocholsäure kommt, wie *Jolin*[2]) gezeigt hat, eine zweite Glykocholsäure vor, die er als β-Hyoglykocholsäure beschrieben hat. Die *Strecker*sche Säure nennt er α-Hyoglykocholsäure. Diese zwei Säuren unterscheiden sich voneinander unter anderem auch dadurch, daß ihre Alkalisalze von Neutralsalzen verschiedener Art ungleich leicht ausgesalzen werden, und auf ihrer verschiedenen Aussalzbarkeit durch Natriumsulfat gründete *Jolin* sein Verfahren zu ihrer Trennung. Eine Trennung und Reindarstellung der beiden Säuren ist äußerst schwer zu erzielen, und *Jolin* hat keine detaillierte Methode mit Angaben über die zur Trennung geeigneten Salzmengen ausgearbeitet. Aus dem Grunde hat Verfasser versucht, wenigstens die Hauptzüge eines Verfahrens auszuarbeiten, welches einer Verbesserung fähig sein dürfte.

Dieses Verfahren basiert auf der verschiedenen Fällbarkeit der Alkalisalze der beiden Säuren durch kalkfreies NaCl. Bei Sättigung mit NaCl werden beide Salze fast vollständig ausgesalzen; während aber das α-Salz

[1]) *C. Gundelach* und *Ad. Strecker*, Untersuchung der Schweinegalle. Annalen der Chemie und Pharmazie. Bd. **62**. S. 205—232. Heidelberg 1847.

[2]) *Severin Jolin*, Über die Säuren der Schweinegalle. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **12**. S. 512—557. Straßburg 1888 und Bd. **13**. S. 205—247. Straßburg 1889.

schon mit 3—5% NaCl eine reichliche Fällung gibt, wird das β-Salz (in 2%iger Lösung) kaum von 10% NaCl gefällt.

Die Galle soll man ganz frisch in Arbeit nehmen und mit Alkohol von dem „Schleime" reinigen. Die alkoholische Lösung kann dagegen ohne Schaden monatelang aufbewahrt werden. Eine höchstens 2%ige Lösung der schleimfreien Galle in Wasser versetzt man mit dem gleichen Volumen gesättigter (kalk- und magnesiafreier) Kochsalzlösung unter starkem Umrühren und läßt 12—24 Stunden stehen. Der gelbgefärbte Niederschlag, welcher 50—60% der Gallensalze enthält, wird durch Filtration leicht von der stärker gelbgefärbten Lösung getrennt. Der Niederschlag wird auf α-Hyoglykocholsäure und das Filtrat auf β-Hyoglykocholsäure verarbeitet.

Die α-Hyoglykocholsäure, $C_{27}H_{43}NO_5$. Den mit dem Filtrum stark ausgepreßten Niederschlag löst man in so viel Wasser, daß die Lösung zwischen 1 und 2%, jedenfalls nicht mehr als 2% enthält, was leicht ungefähr berechnet werden kann, da der Niederschlag 50—60% der in Arbeit genommenen Menge beträgt. Diese Lösung wird mit $^1/_5$ ihres Volumens gesättigter NaCl-Lösung unter Umrühren versetzt, wobei der Gehalt an NaCl also etwas mehr als 5% beträgt. Man erwärmt nun das Ganze, wobei der Niederschlag sich vollständig löst und die Flüssigkeit etwas grünlich wird. Beim Erkalten scheidet sich das Hyoglykocholat wieder aus, man filtriert aber erst nach 12 bis 24 Stunden. Bei der mikroskopischen Untersuchung findet man, daß die Fällung aus lauter dünnen Blättchen und Pseudokristallen besteht, und die oberste Schicht enthält bisweilen Drusen von lang ausgezogenen, spießigen Blättchen. Von einer Beimengung des β-Salzes, welches als Tropfen sich ausscheidet, ist meistens nichts zu sehen. Die abfiltrierte, stark ausgepreßte Fällung wird in starkem Alkohol gelöst, von etwa ungelöstem NaCl filtriert, das Filtrat eingetrocknet und von dem Rückstande eine 2%ige Lösung in Wasser bereitet, die in obiger Weise mit 5% NaCl gefällt wird. Das Salz ist nun regelmäßig frei von dem β-Salze (so weit man dies aus dem Aussehen des Niederschlages mit dem Mikroskope ersehen kann). Der Sicherheit halber kann man aber die Lösung und Fällung noch einmal wiederholen.

Zur Darstellung der freien Säure löst man das Salz, welches rein weiß ist oder einen Stich in Bläulichgrün zeigt, in Wasser zu einer Lösung von höchstens 0·5%. Die Lösung wird in einer Flasche mit überschüssigem Äther geschüttelt und darauf Essigsäure zu 0·5 bis höchstens 1% zugesetzt und umgeschüttelt. Die Säure scheidet sich an der Ätherschicht nach und nach in kleinen Drusen von Kristallen und in der Flüssigkeit als ein kristallinisches Pulver aus. Nach dem Abfiltrieren, Auspressen und Trocknen wird die Säure mit Äther extrahiert, um etwa verunreinigende Fettsäuren zu entfernen. Durch Auflösen in Alkohol und Zusatz von Wasser zur beginnenden Trübung kann sie wenigstens zum großen Teil in Drusen oder Ballen von meistens 6seitigen Blättchen gewonnen werden. Besser und vollständig gelang die Umkristallisation aus einem Gemenge von Alkohol und Aceton unter Wasserzusatz.

Über die Eigenschaften der in dieser Weise dargestellten Säure liegen noch keine eingehenden Untersuchungen vor. Die Angaben von *Gundelach* und *Strecker* und von *Jolin* beziehen sich auf die amorphe Säure. Sp. Drehung der freien Säure in absolutem Alkohol bei etwa 24° nach *Jolin* $(\alpha)D = +9 \cdot 7°$. Schmelzpunkt nicht genau bestimmbar, gegen 150°. In Wasser sehr schwer löslich; leicht löslich in Alkohol, nicht ganz unlöslich in Äther. Alkalisalze aussalzbar durch Neutralsalze, fällbar durch Salze der Erdalkalien und der Schwermetalle.

Die β-Hyoglykocholsäure, $C_{26}H_{43}NO_5$ (?), erhält man aus dem obengenannten, mit NaCl halbgesättigten Filtrate. Man fällt dieses vollständig mit Eisenchlorid ohne großen Überschuß. Den mit Wasser ausgewaschenen Niederschlag zersetzt man in der Wärme mit Sodalösung, filtriert, trocknet ein, löst in Alkohol, filtriert, trocknet von neuem ein und löst in Wasser zu einer 2%igen Lösung, die noch einmal mit dem gleichen Volumen gesättigter NaCl-Lösung gemischt wird. Die, meistens nicht reichliche Fällung besteht regelmäßig aus lauter Tropfen des β-Salzes und wird nach 24 Stunden abgetrennt. Das neue Filtrat kann nun als frei von α-Säure angesehen werden. Es wird von neuem mit Eisenchlorid gefällt und wie oben behandelt. Die Hauptmasse der Farbstoffe ist während dieser Prozeduren entfernt worden, den Rest entfernt man nötigenfalls mit Tierkohle. Aus der wässerigen Lösung des Alkalisalzes wird nun durch Zusatz von Salzsäure die β-Hyoglykocholsäure als eine flockige, käsige Masse ausgefällt. Sie wird mit Wasser gewaschen, getrocknet, in Alkohol gelöst und aus dieser Lösung mit Äther (zur Entfernung der Fettsäuren) gefällt. Die so gefällte Säure enthält auch Hyotaurocholsäure. Zur Entfernung derselben wird sie in Alkohol gelöst und aus dieser Lösung mit Wasser gefällt. Hierbei erhält man jedoch keine flockige Ausfällung, sondern eine kolloidale Lösung, aus welcher selbst nach mehreren Tagen nur ein Teil der Säure als ein feiner Schlamm sich abgesetzt hat. Durch Zusatz von NaCl-Lösung (1—2%) scheidet sie sich jedoch als flockige, käsige Massen aus, die leicht gewaschen und getrocknet werden können. Selbst in dieser Weise hat Verf. sie bisher jedoch nicht frei von Taurocholsäure (oder richtiger schwefelfrei) erhalten können. Auch die von *Jolin* dargestellte Säure war schwefelhaltig und kristallisierte nicht.

Die β-Säure ähnelt sehr der α-Säure; da sie aber bisher nicht rein dargestellt wurde, sind ihre Eigenschaften nicht näher bekannt.

B. Darstellung der Taurocholsäuren.

a) Die Taurocholsäure ($C_{26}H_{45}NSO_7$).

Als Rohmaterial eignet sich am besten schleimfreie Hundegalle. Eine 2—5%ige Lösung in Wasser versetzt man mit einer 5%igen Lösung von Eisenchlorid, bis in der sauer gewordenen Lösung keine Fällung mehr entsteht. Der abfiltrierte Niederschlag enthält Farbstoff und Taurocholeinsäure und wird zur Darstellung der letzteren verwendet.

Das Filtrat wird mit Sodalösung oder verdünnter Natronlauge zur Abstumpfung der sauren Reaktion, aber nicht zu neutraler Reaktion versetzt und von der neu entstandenen Eisenfällung abfiltriert. Das Filtrat wird noch einmal mit Eisenchlorid versetzt, mit Wasser etwas verdünnt und (ohne Filtration von dem hierbei etwa entstandenen Niederschlage) mit Soda wie oben versetzt. Der dann abfiltrierte Niederschlag wird zusammen mit den anderen Eisenfällungen zur Darstellung von Taurocholeinsäure benutzt. Das Filtrat ist allerdings noch nicht ganz frei von Taurocholeinsäure, die Menge derselben ist aber nicht so groß, daß sie die Reindarstellung der Taurocholsäure verhindert.

Das Filtrat wird nun mit Soda schwach alkalisch gemacht, das Eisenhydroxyd wird abfiltriert und das neue Filtrat bei Zimmertemperatur mit NaCl gesättigt. Das Taurocholat scheidet sich hierbei als eine grobflockige Fällung aus, die, von dem gefärbten Filtrate getrennt, ausgepreßt und in Wasser gelöst, durch neues Aussalzen regelmäßig rein weiß erhalten wird. Durch wiederholte Alkoholbehandlung von dem beigemengten Kochsalze getrennt, kann das Taurocholat leicht in reinem Zustande gewonnen werden.

Zur Darstellung der freien Säure[1]) löst man das Taurocholat in möglichst wenig absolutem Alkohol und versetzt die Lösung mit schwefelsäurehaltigem Alkohol, bis zu 2—3% Säure, oder mit Salzsäure bis zu 2% in der Lösung. Das hierbei ausfallende Sulfat, bzw. Kochsalz, wird abfiltriert und das Filtrat mit überschüssigem Äther gefällt. Wenn man es schwer findet, das Taurocholat ohne Anwendung von ziemlich viel Alkohol zu lösen, so kann man auch in der Weise verfahren, daß man das fein zerriebene Taurocholat direkt mit säurehaltigem Alkohol behandelt. Hierbei wird die Taurocholsäure frei, von dem Alkohol gelöst, und wird wie im ersten Falle durch überschüssigen Äther aus dem Filtrate amorph ausgefällt.

Von der amorph ausgefällten Säure kann die Flüssigkeit gewöhnlich ohne Verluste einfach abgegossen werden, widrigenfalls wird filtriert. Die amorphe Säure wird nun in wenig Alkohol gelöst, die filtrierte Lösung mit ein wenig Wasser versetzt und darauf Äther bis zur bleibenden Trübung zugefügt. Die Säure scheidet sich bald in Nadeln oder Prismen und Drusen von solchen aus. Da die Kristallisation aufgehört hat, fügt man neuen Äther, bis zur neuen Trübung hinzu, wartet die neue Kristallisation ab und wiederholt dieses Verfahren, bis keine Kristalle mehr entstehen. Die Säure kann man aus Alkohol, der etwas Wasser enthält, durch Ätherzusatz wiederholt umkristallisieren.

Die Darstellung der Taurocholsäure aus Rindergalle ist schwer infolge der Schwierigkeit, das Taurocholat vollständig von dem Glykocholate zu reinigen. Man kann zwar durch wiederholte Fällung mit Eisenchlorid,

[1]) *Olof Hammarsten*, Über die Darstellung kristallisierter Taurocholsäure. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 43. S. 127—144. Straßburg 1904/1905.

teils allein, teils nach Zusatz von Soda wie oben und teils nach Verdünnung mit Wasser, zuletzt dahin kommen, daß man ein von Glykocholat freies Taurocholat aussalzen kann; aber dies gelingt nicht immer.

Das von *Bang*[1]) angegebene Verfahren, die Taurocholsäure aus saurer Lösung mit Eiweiß zu fällen, welches Verfahren darauf basiert, daß nur die Taurochol-, nicht aber die Glykocholsäure von Eiweiß gefällt werden soll, ist nicht zu empfehlen. In einer sauren Lösung von Glyko- und Taurocholat ist nämlich die Taurocholsäure das Lösungsmittel für die Glykocholsäure; und wenn man die erstere mit Eiweiß ausfällt, kann die in Wasser äußerst schwer lösliche Glykocholsäure nicht mehr in Lösung bleiben, sondern wird ebenfalls ausgefällt. Zur Reindarstellung der Taurocholsäure ist deshalb die Rindergalle wenig geeignet. Ein vorzügliches Material ist dagegen die Fischgalle, wenn man solche in größerer Menge erhalten kann.

Eigenschaften: Nadeln oder vierseitige, zu Drusen vereinigte Prismen, die luftbeständig sind. Die Säure wird schon unter 100^0 gelb bis bräunlich und zeigt keinen bestimmten Schmelzpunkt. Leicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol und fast unlöslich in Äther. In Wasser lösliche Salze mit Alkalien, Erdalkalien und vielen Schwermetallen. Sp. Drehung des Natriumtaurocholates in Wasser nach *Hoppe-Seyler*[2]) $(\alpha)D = +21 \cdot 5^0$. Nach Verf.[3]) ist die Drehung abhängig von der Konzentration: $(\alpha)D = +23 \cdot 27^0$ ($c = 2 \cdot 32^0/_0$) und $= +22 \cdot 14^0$ ($c = 5 \cdot 42^0/_0$). Geschmack süß, nur schwach bitter.

b) Taurocholeinsäure ($C_{26}H_{45}NSO_6$?)

stellt man nach folgendem, teils vom Verfasser[4]) und teils von *Gullbring*[5]) herrührenden Verfahren dar.

Die bei Darstellung der Taurocholsäure erhaltenen Eisenfällungen werden mit Soda in warmem Wasser zerlegt, die Lösung abfiltriert, eingetrocknet und der Rückstand mit Alkohol extrahiert, wobei ein recht bedeutender Teil des Farbstoffes ungelöst zurückbleibt. Die mit Tierkohle entfärbte alkoholische Lösung wird zur Trockene verdunstet und in ganz derselben Weise, wie für die Darstellung der Taurocholsäure angegeben wurde, mit säurehaltigem Alkohol zersetzt und mit Äther behandelt. Wenn man hierbei so weit gekommen ist, daß keine Kristalle von Taurocholsäure sich mehr ausscheiden, sondern nur eine honig- oder harzähnliche Bodenschicht sich absetzt, gießt man den Alkoholäther ab, führt die Säure in das Natriumsalz über und fällt die wässerige Lösung des letzteren mit Eisenchlorid. Hierbei wird die Taurocholeinsäure gefällt, während die kleinen Reste der Taurocholsäure in Lösung bleiben. Aus der Eisenfällung

[1]) *Ivar Bang*, Über die Darstellung der Taurocholsäure. Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie von *F. Hofmeister*. Bd. 7. S. 148—149. Braunschweig 1906.

[2]) *F. Hoppe-Seyler*, Über die Zirkumpolarisationsverhältnisse der Gallensäuren und ihrer Zersetzungsprodukte. Journ. f. prakt. Chemie. Bd. 89. S. 257—281. Leipzig 1863.

[3]) Nicht veröffentlichte Untersuchung.

[4]) *Olof Hammarsten*, Über die Darstellung kristallisierter Taurocholsäure. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 127—144. Straßburg 1904/1905.

[5]) *Alf Gullbring*, Über die Taurocholeinsäure der Rindergalle. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **45**. S. 448—458. Straßburg 1905.

stellt man von neuem das Natriumsalz dar. löst es in absolutem Alkohol. zerlegt es mit säurehaltigem Alkohol und fällt das Filtrat mit überschüssigem Äther. Die Säure setzt sich dabei als eine sirup- oder honigähnliche Schicht zu Boden und ist bisher nicht in Kristallen erhalten worden.

Zur Darstellung der Säure aus Rindergalle benutzt man den nach möglichst vollständigem Auskristallisieren der Taurocholsäure zurückgebliebenen Alkoholäther, aus dem man mit Sodalösung und Verdunsten das Natriumsalz erhält. Aus diesem wird dann die Eisenverbindung dargestellt und wie oben (in der letzten Phase der Methode) verfahren. Alle die bei Darstellung der Taurocholsäure aus Rindergalle in Betracht kommenden Schwierigkeiten machen sich auch bei Darstellung der Taurocholeinsäure geltend.

Eigenschaften: Die Säure löst sich leicht in Wasser oder Alkohol, nicht in Äther. Geschmack intensiv widrig bitter. Die Alkalisalze werden in wässeriger Lösung von Eisenchlorid gefällt. Die Eigenschaften der noch nicht sicher rein dargestellten Säure sind im übrigen nicht studiert.

C. Darstellung der Scymnolschwefelsäuren.

In den Gallen der bisher untersuchten Plagiostomen kommen nach den Untersuchungen des Verfassers [1]) statt der gewöhnlichen gepaarten Gallensäuren Schwefelsäureester von zwei, der Cholalsäure und dem Cholesterin, wie es scheint, verwandten Stoffen, die wahrscheinlich Alkohole sind, vor. Es kommen als Alkalisalze in der Haifischgalle zwei solche Schwefelsäureester vor, die als α- und β-Scymnolschwefelsäure bezeichnet wurden.

Die Darstellung geschieht in folgender Weise. Die Lösung der schleimfreien Galle in Wasser wird mit Bleiessig und Ammoniak gefällt, wobei die reichlichen Harnstoffmengen in Lösung bleiben. Aus dem Bleiniederschlage stellt man in gewöhnlicher Weise mittelst Sodalösung die Natriumsalze dar, die, nach dem Eintrocknen, durch Extraktion mit Alkohol gereinigt werden. Die 3—5%ige Lösung der Alkalisalze in Wasser wird dann mit dem gleichen Volumen Kalilauge von 40% gemischt. Hierbei scheidet sich das Salz der α-Säure als eine reine weiße Masse ab, die aus mikroskopischen Nadeln besteht, während das β-Scymnolsalz mit etwas α-Salz in Lösung bleibt. Man trennt das Salz von der Lauge durch Zentrifugieren.

Das α-Salz reinigt man durch zweimal wiederholtes Auflösen in Wasser und Ausfällung mit Kalilauge wie oben. Man löst dann in Wasser, neutralisiert den größten Teil des Alkalis mit verdünnter Schwefelsäure und leitet überschüssige Kohlensäure durch. Darauf wird mit Alkohol die Hauptmenge des Sulfates ausgefällt, filtriert, eingetrocknet, in Alkohol gelöst, von Sulfat und Karbonat abfiltriert, eingetrocknet und von neuem mit Alkohol behandelt, bis alles Sulfat und Karbonat entfernt worden ist. Zu-

[1]) *Olof Hammarsten*, Über eine neue Gruppe gepaarter Gallensäuren. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 24. S. 322—350. Straßburg 1898.

Jetzt fällt man das Salz aus alkoholischer Lösung mit Äther, saugt nach einiger Zeit ab, wäscht mit Äther nach, preßt aus und läßt im Exsikkator trocknen.

Das β-Salz gewinnt man aus der obengenannten, abzentrifugierten Lauge. Man verdünnt etwas mit Wasser, neutralisiert langsam und vorsichtig (unter Kühlung) fast vollständig mit Schwefelsäure und zuletzt mit Kohlensäure. Man konzentriert, fällt die Hauptmasse des Sulfates mit Alkohol, filtriert, verdunstet zur Trockene und extrahiert mit Alkohol. Das Gallensalzgemenge wird nun in Wasser (zu 4%) gelöst und mit starker Lauge bis zu 30% in dem Gemenge versetzt, um das verunreinigende α-Salz zu entfernen. Dann wird mit der abzentrifugierten Lauge wie oben verfahren und die Prozedur wiederholt, bis man eine Lösung erhält, welche bei einem Gehalt von 30% KOH nicht getrübt wird. Aus dieser Lösung wird das β-Salz in derselben Weise, wie oben für das α-Salz angegeben worden, gewonnen.

Zur Darstellung der Scymnole wird jedes Salz für sich etwas mehr als 1 Stunde mit 10%iger Kalilauge gekocht. Es findet hierbei vollständige Zersetzung statt, und die Scymnole scheiden sich als ölige Massen aus. Das α-Scymnol kann nach dem Lösen in kochendem Wasser beim Erkalten in nadelförmigen Kristallen sich ausscheiden und in dieser Weise gereinigt werden. Man kann es auch aus seiner Lösung in kaltem Alkohol durch Zusatz von Wasser bis zur bleibenden Opaleszenz umkristallisieren. Das β-Scymnol kann aus alkoholischer Lösung mit Wasser ausgefällt werden und ist bisher nicht ganz rein, nur als amorphe Masse erhalten worden.

Eigenschaften: α-Scymnol, $C_{27}H_{46}O_5$, feine Kristallnadeln, die bei 100—101° C schmelzen; zersetzen sich erst oberhalb 135°. Leicht löslich in Alkohol, Äther und Aceton, nur sehr schwer löslich in kaltem Benzol oder Chloroform. Gibt eine schöne *Pettenkofer*sche Reaktion, die *Schiff*sche Cholesterinreaktion, und eine der *Liebermann-Burchard*schen Cholesterinreaktion ähnliche Reaktion: Mit Salzsäure von 25% gibt es bei Zimmertemperatur nach einiger Zeit eine prachtvoll indigblaue Lösung. Das β-Scymnol, $C_{29}H_{50}O_5$, gibt unter ähnlichen Umständen eine grünlichbraune Lösung. Die Alkalisalze der Scymnolschwefelsäuren geben eine entsprechende Färbung. Sie sind löslich in Wasser oder Alkohol, nicht löslich in Äther. Geschmack bittersüß; das β-Salz hat einen mehr bitteren Nebengeschmack. Ihre Lösungen in Wasser werden nicht von Salzen der Erdalkalien oder Schwermetalle, mit Ausnahme von Eisenchlorid und basischem Bleiacetat, gefällt.

II. Darstellung der Cholalsäuren und ihrer nächsten Derivate.

a) Darstellung der Cholsäure.

Das ursprüngliche Verfahren von *Ad. Strecker*[1]) ist im Laufe der Zeit in dem einen oder anderen Punkte von anderen Forschern, unter

[1]) *Adolph Strecker*, Untersuchungen der Ochsengalle. Zweite Abhandlung. Annal. der Chemie u. Pharmazie. Bd. **67**. S. 1—60. Heidelberg 1848.

denen besonders *Mylius*[1]), *Latschinoff*[2]), *Lassar-Cohn*[3]), *Pregl*[4]), *Vahlen*[5]) und *Langheld*[6]) zu nennen sind, abgeändert worden. Nach Prüfung verschiedener Methoden hat Verf. das folgende Verfahren, welches im wesentlichen mit demjenigen von *Pregl* übereinstimmt, als das einfachste und beste gefunden.

Von der schleimfreien Galle wird eine 5%ige Lösung in Wasser bereitet, mit $^1/_4$ Volumen Natronlauge von 30% gemischt und 30 Stunden in einem eisernen Gefäße, am einfachsten in einem größeren Autoklaven gekocht. Nach dem Erkalten wird die Hauptmasse des Alkalis neutralisiert, filtriert und darauf mit Salzsäure die Rohsäure gefällt. Nach dem Abgießen der Flüssigkeit und Nachspülen mit Wasser löst man die Rohsäure mit Hilfe von Ammoniak und fällt aus einer Lösung, die nicht mehr als 2% Gallensäure enthält, mit einer 20%igen Lösung von Chlorbaryum, bis nach vollständiger Klärung der Flüssigkeit neue Zusätze von Chlorbaryum keine Fällung erzeugen. Man filtriert von der Baryumfällung, welche zur Darstellung von Cholein- und Desoxycholsäure dient, ab und fällt aus dem Filtrate die Rohsäure mit Salzsäure.

Sobald die Rohsäure einen festen Kuchen oder eine sandige Masse darstellt, wird die Flüssigkeit abgegossen bzw. abfiltriert, die Säure mit Wasser fein zerrieben und durch Waschen von Salzsäure befreit. Sie wird nun wiederholt mit starkem Alkohol in kleinen Mengen unter Umrühren oder Kneten versetzt, bis sie in einen Brei von Kristallen sich verwandelt hat. Man kann aber auch die vorher an der Luft getrocknete oder fein zerriebene Rohsäure mit Alkohol von 95% (höchstens 2 Teilen) mischen. In beiden Fällen saugt man den Alkohol von der Kristallmasse ab, wäscht mit ein wenig Alkohol nach, zerreibt noch einmal mit Alkohol, saugt ab und wäscht mit Alkohol nach. Die Säure ist nun regelmäßig fast weiß und

---

[1]) *F. Mylius*, Über die Cholsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 369—379. Berlin 1886. — Derselbe, Notiz über die Darstellung und Zusammensetzung der Cholsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie von *F. Hoppe-Seyler*. Bd. **12**. S. 262—266. Straßburg 1888.

[2]) *P. Latschinoff*, Über die Cholsäure, welche feste Fettsäuren enthält. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **13**. S. 1911—1915. Berlin 1880.

[3]) *Lassar-Cohn*, Zur Kenntnis der Säuren der Rindergalle. III. Mitteilung. Zeitschrift f. physiol. Chemie von *F. Hoppe-Seyler*. Bd. **17**. S. 607—615. Straßburg 1893. — Derselbe, Die Säuren der menschlichen Galle. Ebenda. Bd. **19**. S. 563—573. Straßburg 1894.

[4]) *Fritz Pregl*, Über die Darstellung und einige Reaktionen der Cholalsäure. Arch. f. d. ges. Physiologie von *E. Pflüger*. Bd. **71**. S. 303—317. Bonn 1898. — Derselbe, Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **111**. Abt. IIb. S. 1024—1071. Wien 1902.

[5]) *E. Vahlen*, Die spezifische Rotation der Cholalsäure, Choleinsäure und Desoxycholsäure. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **21**. S. 253—273. Straßburg 1895/96.

[6]) *K. Langheld*, Über die Bestandteile der Rindergalle. I. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 378—385. Berlin 1908.

wird aus heißem Alkohol umkristallisiert, bis sie bei 195—196° schmilzt. Aus den Kristallisationsmutterlaugen erhält man durch Konzentration neue Mengen Säure, die umkristallisiert werden, bis man eine weiße Säure von dem obigen Schmelzpunkte erhält. Die Ausbeute an reiner Säure, als kristallalkoholfrei berechnet, beträgt gewöhnlich 40—45 bis gegen 50% von der Rohsäure.

Die zuletzt erhaltenen, nicht kristallisierenden alkoholischen Mutterlaugen werden auf die anderen Cholalsäuren verarbeitet, wobei man noch etwas mehr Cholsäure erhält. Die zuerst abgesogene, fast schwarzbraune alkoholische Lösung, welche ebenfalls etwas Cholsäure, aber verhältnismäßig viel Desoxycholsäure (bzw. Choleinsäure) enthält, wird ebenfalls, wie später angegeben werden soll, auf die anderen Cholalsäuren verarbeitet.

Beim Verarbeiten von Sommergallen kann es nach *Pregl* und *Langheld* sich ereignen, daß die aus dem Filtrate von der Baryumfällung oder die direkt gefällte Rohsäure keinen festen Kuchen absetzt, sondern weich bleibt und mit Wasser eine emulsionähnliche Masse gibt, die weder feucht noch nach dem Trocknen in eine kristallinische Masse beim Reiben mit Alkohol übergeht. Verf. hat keine eigene Erfahrung hierüber; *Pregl* kam aber in solchen Fällen auf folgende Weise zum Ziele.

Die aus dem Filtrate von der Baryumfällung ausgefällte Säure wurde getrocknet, pulverisiert, in Wasser zu einer 1%igen Lösung unter Zusatz von Ammoniak gelöst und dann so vollständig wie möglich mit Chlorbaryumlösung von 20% gefällt (eine mehr konzentrierte Lösung des Gallensalzes gab keine Fällung mit Chlorbaryum). Hierbei wurden die störend wirkenden dyslysinartigen Stoffe gefällt und aus dem neuen Filtrate konnte nun mit Salzsäure eine Rohsäure gefällt werden, die, in obiger Weise mit Alkohol behandelt, kristallinisch wurde und die er durch Umkristallisieren rein erhielt.

Nach *Langheld,* welcher die Rohsäure direkt, ohne vorausgegangene Fällung mit Chlorbaryum verarbeitet, soll man in folgender viel einfacherer Weise zum Ziele kommen. Zu der alkoholischen Lösung der Rohsäure setzt man überschüssiges Natriumhydroxyd, in wenig Wasser gelöst und erwärmt 1—2 Stunden auf dem Wasserbade. Während dieser Zeit scheidet sich das cholsaure Natrium nahezu quantitativ[1]) in Gestalt kleiner weißer Nadeln ab. Es wird möglichst heiß abgesaugt und mit viel siedendem Alkohol gewaschen. Aus dem Salze wird dann die Cholsäure freigemacht, getrocknet und mit dem doppelten Gewichte Alkohol vermengt, wobei sie Kristallalkohol aufnimmt.

Eigenschaften: Tetraedrische Kristalle mit 1 Mol. Kristallalkohol oder Prismen mit 1 Mol. Wasser (aus Eisessig durch Verdünnung mit

[1]) Dies klingt sonderbar, da das cholsaure Natrium in Alkohol, besonders in heißem löslich ist. In den vom Verf. bisher ausgeführten Kontrollversuchen mit Cholsäure in alkoholischer Lösung und Natriumhydroxyd konnte von einer nahezu quantitativen Ausfällung keine Rede sein. Da es hier um eine Konzentrationsfrage sich handelt, sind weitere quantitative Versuche notwendig.

Wasser) oder nach *Mylius* kristallwasserfrei (aus siedendem Wasser). Schmelzpunkt 195—196°. Gibt mit Jod eine blaue Verbindung. Löslich in 4000 Teilen kaltem und 750 Teilen siedendem Wasser. Löslich in Alkohol (in mehr als 20 Teilen nach *Mylius*), schwer löslich in Äther und Aceton. Geschmack bitter und süßlich. Alkalisalze leicht löslich in Wasser, weniger leicht in Alkohol. Baryumsalz löslich in Alkohol und in 30 Teilen kaltem Wasser, leichter in heißem. Spezifische Drehung in alkoholischer Lösung nach *Vahlen* für die tetraedrische Säure (α) D = + 31·55°, für die kristallwasserfreie = + 37·02°. Für das Kaliumsalz in 3%iger Lösung (α) D = = + 27—27·6°; für das Natriumsalz in Wasser, 4%ige Lösung, (α) D = = + 27·6°.

b) Darstellung der Choleinsäure und der Desoxycholsäure.

Nachdem *Latschinoff*[1] (1885) in der Rindergalle eine zweite Cholalsäure, die er Choleinsäure nannte, entdeckt und dann in weiteren Arbeiten näher beschrieben hatte, gelang es *Mylius*[2]) aus gefaulter Galle eine Cholalsäure zu isolieren, die er als durch Reduktion aus der Cholsäure entstanden sich vorstellte und deshalb Desoxycholsäure nannte.

Die Frage, ob es wirklich zwei verschiedene solche Säuren gibt oder ob nicht beide identisch sind, ist lange strittig gewesen. *Latschinoff*, dem sich *Lassar-Cohn*[3]) anschloß, erklärte beide für identisch. *Mylius* und *Vahlen*[4]) erklärten beide für verschieden. Ohne auf die strittige Frage näher einzugehen, muß Verf. hier nur folgendes hervorheben. Daß in der Rindergalle eine Säure von den Eigenschaften der *Mylius*schen Desoxycholsäure präformiert vorkommt, hat *Pregl*[5]) in unzweifelhafter Weise bewiesen. Das Vorkommen einer präformierten Säure von den Eigenschaften der *Latschinoff*schen Choleinsäure ist ferner von vielen Forschern bestätigt worden und in neuester Zeit hat *Langheld*[6]) beide Säuren aus derselben Galle isoliert. Dasselbe ist auch dem Verf. gelungen; die Desoxycholsäure kam jedoch in viel reichlicher Menge vor oder war jedenfalls leichter rein darzustellen.

Beide Säuren geben Baryumsalze, die viel schwerlöslicher in Wasser als das Baryumsalz der Cholsäure sind, und auf diesem Verhalten kann

---

[1]) *P. Latschinoff*, Über eine der Cholsäure analoge Säure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 3039—3047. Berlin 1885. — Derselbe, Über die Choleinsäure. Ebenda. Bd. **19**. S. 1140 (1886). — Derselbe, Über die Gallensäuren. Ebenda. Bd. **20**. S. 1043 bis 1053 (1887). — Derselbe, Über die Kristallform der Choleinsäure. Ebenda. Bd. **20**. S. 1053—1056 (1887).

[2]) *F. Mylius*, Über die Cholsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 369—379. Berlin 1886. — Derselbe, Über die Cholsäure. IV. Mitt. Ebenda. Bd. **20**. S. 1968—1989. Berlin 1887.

[3]) *Lassar-Cohn*, Zur Kenntnis der Säuren der Rindergalle. Zeitschr. f. physiol. Chemie von *F. Hoppe-Seyler*. Bd. **17**. S. 607—615. Straßburg 1893.

[4]) *E. Vahlen*, Die spezifische Rotation der Cholalsäure, Choleinsäure und Desoxycholsäure. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **21**. S. 253—273. Straßburg 1895/96.

[5]) *Fritz Pregl*, Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **111**. Abt. IIb. S. 1024—1071. Wien 1902.

[6]) *K. Langheld*, Über die Bestandteile der Rindergalle. I. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 378—385. Berlin 1908.

man ihre Trennung von der Cholsäure gründen. Für die Trennung der Baryumsalze der Cholein- und Desoxycholsäure voneinander findet man dagegen keine geeigneten Vorschriften, und man erhält deshalb gewöhnlich ein Gemenge von Baryumsalzen bzw. ein Gemenge der aus ihnen freigemachten Säuren. Das komplizierte Verfahren von *Langheld* liefert auch nur ein Gemenge der zwei Säuren und bietet infolgedessen keine besonderen Vorteile vor der Ausfällung der Säuren als Baryumsalze.

Das vom Verf. ausgearbeitete Verfahren, welches im wesentlichen auf den Angaben oder Methoden der oben (S. 658) zitierten Forscher basiert, ist folgendes.

Die Choleinsäure, $C_{24}H_{40}O_4$ (oder $C_{25}H_{42}O_4$ nach *Latschinoff*), erhielt Verf. auf folgende Weise. Bei der Darstellung der Cholsäure (vgl. oben) erhält man eine Baryumfällung der Rohsäuren (die als Rohbaryumfällung bezeichnet wird), ferner stark gefärbte alkoholische Extrakte nach der ersten Alkoholbehandlung und der ersten Umkristallisation der Rohsäure (als Rohextrakte bezeichnet) und endlich nur wenig gefärbte alkoholische Mutterlaugen nach der Umkristallisation der gereinigten Säure. Die letzteren werden nicht mit den Rohextrakten zusammengemischt, sondern gesondert verarbeitet. Diese letzten Mutterlaugen und ebenso etwaige letzte Cholsäurekristallisationen, die nicht aus rein tetraedrischen Kristallen bestehen und die nicht den richtigen Schmelzpunkt zeigen, löst man in Wasser mit Hilfe von Ammoniak und fällt mit Chlorbaryum so vollständig wie möglich. Die Baryumfällung, die oft ohne weiteres kristallisiert, löst man in heißem Alkohol. Beim Erkalten kristallisiert das Salz und im Laufe von ein paar Tagen ist alles in einen dicken Brei verwandelt. Man saugt ab, wäscht mit Alkohol ein paarmal nach und preßt aus. Das Baryumsalz löst man noch einmal in heißem Alkohol, nötigenfalls mit Wasser verdünnt, weil die Lösung nicht immer gelingt, wenn man starken Alkohol nimmt. Das umkristallisierte Baryumsalz zersetzt man in Wasser mit Salzsäure, filtriert die freie Säure ab, wäscht sie mit Wasser, preßt aus und trocknet über Schwefelsäure. Die getrocknete Säure löst man in wenig heißem absoluten Alkohol, filtriert wenn nötig und läßt erkalten. Es scheiden sich hierbei Kristalle von Choleinsäure ab, die im Laufe von einigen Tagen sich weiter vermehren. Die Kristalle haben bisweilen direkt den Schmelzpunkt 185—187°, sonst werden sie aus heißem Alkohol umkristallisiert. Aus den alkoholischen Filtraten kann man durch weitere Konzentration noch eine Portion Kristalle erhalten, die aber leicht von Desoxycholsäure verunreinigt sein können und dementsprechend auf Schmelzpunkt geprüft bzw. umkristallisiert werden müssen. Die bis zu dünnem Sirup konzentrierten alkoholischen Mutterlaugen werden, wenn sie keine Kristalle mehr absetzen, auf Desoxycholsäure verarbeitet.

Aus den bei der Umkristallisation der Baryumsalze zurückbleibenden alkoholischen Mutterlaugen kann man mit Wasser und Salzsäure Reste der Säuren gewinnen, die nach dem obigen Prinzipe (Kristallisation aus Alkohol) verarbeitet werden. Die aus dem Filtrate von der ersten Baryumfällung

mit Salzsäure zurückgewonnene Säure besteht zum großen Teil aus Cholsäure.

Die Ausbeute an Säure aus den wenig gefärbten, alkoholischen Mutterlaugen ist nicht groß, man erhält aber die Säure fast sogleich weiß und rein.

Die Verarbeitung der gefärbten alkoholischen Extrakte ist umständlicher. Man macht sie schwach alkalisch, treibt den Alkohol weg und kocht dann, wie *Pregl*[1]) behufs Darstellung der Desoxycholsäure vorgeschrieben hat, mit Alkalilauge etwa 24 Stunden. Dann fällt man, wie bei der Cholsäurebereitung, die Rohsäure mit Salzsäure aus, löst in Ammoniak und fällt möglichst vollständig mit Chlorbaryumlösung von 20%. Diese Baryumfällung wird mit der obengenannten Rohbaryumfällung vereinigt oder sie werden jedenfalls beide in derselben Weise verarbeitet. Man löst die Baryumfällung in kaltem Alkohol, filtriert von dem stark gefärbten Niederschlag (Baryumseifen, Karbonat u. a.) ab, zersetzt das Filtrat mit überschüssiger Sodalösung in der Wärme, trocknet ein, zerreibt möglichst fein und erschöpft die Masse mit Alkohol. Es werden hierbei neben den Karbonaten gewöhnlich soviel Farbstoffe zurückgehalten, daß eine weitere Entfärbung, trotz der noch ziemlich stark braungelblichen Farbe des Filtrates, nicht notwendig ist. Behufs weiterer Entfärbung kann man Tierkohle verwenden oder auch das siedend heiße alkoholische Filtrat mit einer kleinen Menge einer siedend heißen alkoholischen Lösung von Bleiacetat versetzen und siedend heiß filtrieren. Überschüssiges Blei wird mit Alkalikarbonat entfernt. Eine nicht zu starke Färbung des Filtrates hindert jedoch die folgenden Operationen nicht.

Aus den so gewonnenen Alkalisalzen der Gallensäuren in Wasser wird das Säuregemenge mit Salzsäure ausgefällt; der Niederschlag wird genau gewaschen, ausgepreßt und an der Luft oder im Vakuum getrocknet.

Das feingepulverte Säuregemenge wird nun mit Eisessig zu einem Brei zerrieben. Hierbei werden Farbstoff und Cholsäure gelöst. Man saugt ab und zerreibt noch einmal mit Eisessig, wobei man das Säuregemenge fast weiß erhält. Wenn das Zerreiben mit Eisessig nicht gut geht, indem eine mehr zähe Masse sich bildet, löst man statt dessen in möglichst wenig heißem Eisessig, wobei die Cholsäure gelöst bleibt, während die anderen Säuren beim Erkalten herauskristallisieren.

Zur Trennung und weiteren Reinigung der beiden Säuren kann man nun in verschiedener Weise verfahren. Man kann das in Eisessig ungelöste Säuregemenge in Wasser mit Hilfe von etwas Alkali lösen, verdünnen, die Säuren mit Salzsäure ausfällen, die gewaschenen, getrockneten Säuren in heißem absoluten Alkohol lösen, wie oben, und das Auskristallisieren der Choleinsäure abwarten. Dies gelingt jedoch nur gut in dem Falle, daß das Gemenge nicht zu wenig Choleinsäure im Verhältnis zu der Desoxycholsäure enthält.

---

[1]) *Fritz Pregl,* Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **111**. Abt. IIb. S. 1024—1071. Wien 1902.

Bei Gegenwart von verhältnismäßig wenig Choleinsäure, wenn also keine oder eine nur spärliche Kristallisation aus Alkohol erfolgt, muß man die nach Darstellung der Desoxycholsäure erhaltenen Eisessigmutterlaugen (siehe unten Desoxycholsäure) auf Choleinsäure verarbeiten. Man fällt zu dem Zwecke aus ihnen die Säure mit Wasser, kocht sie mit Natronlauge 12 bis 24 Stunden, um etwa gebildete Acetylderivate zu zersetzen, fällt dann mit Salzsäure, wäscht genau, trocknet und löst in siedendem Alkohol wie oben.

Eigenschaften: Aus Alkohol, wasserfrei, hemiedrische Kristalle des rhombischen Systemes. Schmelzpunkt 185—187°. Wasserhaltig (nach *Latschinoff*) erweicht sie bei 125°, schmilzt bei 135—140°. Geschmack intensiv bitter. Keine blaue Jodverbindung. Sehr schwer löslich in Wasser (1 : 22.000). Leicht löslich in heißem Alkohol, schwer löslich in kaltem. Baryumsalz schwer löslich in kaltem Wasser (1 : 1200); kristallisiert aus siedendem Alkohol beim Erkalten in Aggregaten von radiär gestellten Nadeln. Sp. Drehung in alkoholischer Lösung nach *Latschinoff* $(\alpha)D = +56{\cdot}4^0$ ($c = 6{\cdot}06\%$), nach *Vahlen* $(\alpha)D = +48{\cdot}87^0$ ($c = 2{\cdot}5\%$).

Die Desoxycholsäure, $C_{24}H_{40}O_4$, kann man aus den oben S. 659 erwähnten, nicht mehr kristallisierenden Mutterlaugen von der auskristallisierten Choleinsäure erhalten, wenn man dieselben mit Äther versetzt. Man reinigt die Säure durch Umkristallisieren aus schwachem Alkohol und Ätherzusatz *(Pregl)*. Leichter erhielt Verf. die Säure aus den fast eingetrockneten Mutterlaugen durch Kneten mit Eisessig, Umkristallisation aus Eisessig und zuletzt Umkristallisation aus heißem Aceton.

Zur Darstellung der Desoxycholsäure kann man auch mit großem Vorteil das oben, bei der Darstellung der Choleinsäure erwähnte, mit Eisessig gereinige Säuregemenge verwenden. Ohne dieses, wie dort angegeben, in Wasser mit Alkali zu lösen kristallisiert man es direkt aus Eisessig um, bis man Kristalle erhält, die bei 144—145° C schmelzen. Aus Aceton umkristallisiert sollen sie den Schmelzpunkt 172—173° C haben. Die Eisessigmutterlaugen werden auf Choleinsäure verarbeitet (s. oben).

Zur Darstellung von Desoxycholsäure allein, ohne Berücksichtigung der Choleinsäure, aus den Mutterlaugen nach der Cholsäuredarstellung hat *Pregl* ein genau ausgearbeitetes Verfahren angegeben.[1])

Eigenschaften. Nadeln mit 1 Molekül Essigsäure: Schmelzpunkt 144 bis 145; mit Kristalläther 153—155° *(Pregl)*. Aus Aceton und wasserfrei Schmelzpunkt 172—173°. Geschmack intensiv bitter. Keine blaue Jodverbindung. Sehr schwer löslich in Wasser; leicht löslich in Alkohol, aber etwas schwerlöslicher in Eisessig als die Choleinsäure. Baryumsalz sehr schwer löslich in Wasser; kristallisiert aus siedendem Alkohol beim Erkalten. Sp. Drehung nach *Vahlen*[2]) $(\alpha)D = +49{\cdot}86^0$ ($c = 1{\cdot}968\%$).

---

[1]) *Fritz Pregl*, Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **111**. Abt. II b. S. 1024—1071. Wien 1902.

[2]) *E. Vahlen*, Die spezifische Rotation der Cholalsäure, Choleinsäure und Desoxycholsäure. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **21**. S. 253—273. Straßburg 1895/96.

c) Darstellung von Dehydrochol- und Dehydrocholeinsäure.

Als erstes Oxydationsprodukt der Cholsäure erhielt *Hammarsten*[1]) die um sechs Wasserstoffatome ärmere Dehydrocholsäure, $C_{24}H_{34}O_5$. Nach demselben Verfahren erhielt dann *Latschinoff*[2]) aus seiner Choleinsäure die entsprechende Dehydrocholeinsäure, $C_{24}H_{34}O_4$, und endlich hat *Pregl*[3]) gezeigt, daß auch die Desoxycholsäure bei gelinder Oxydation Dehydrocholeinsäure liefert. Zur Darstellung der letztgenannten Säure kann man also ebensowohl der Desoxycholsäure wie der Choleinsäure sich bedienen.

Beide Säuren, die Dehydrochol- und Dehydrocholeinsäure, werden in ganz derselben Weise nach dem folgenden Verfahren dargestellt. Man bereitet eine 10%ige Lösung von Cholsäure (bzw. Choleinsäure oder Desoxycholsäure) in Eisessig und ferner eine 10%ige Lösung von Chromsäure in Eisessig. Die letztere Lösung läßt man aus einer Bürette in die erstere unter Umrühren vorsichtig einfließen, unter Beachtung, daß die Temperatur nie 50° übersteigt. Bei Verarbeitung von Cholsäure sind auf je 10 cm^3 ihrer Lösung ungefähr 9 und bei Verarbeitung von den zwei anderen Säuren ungefähr 8 cm^3 der Chromsäurelösung erforderlich. Die Lösung nimmt, wenn die Reaktion beendet ist, eine mißfarbige, gelbliche Nuance an, und nach Zusatz von mehr Chromsäurelösung steigt die Temperatur nicht mehr. Man verdünnt nun mit dem vielfachen Volumen Wasser und filtriert nach einiger Zeit. Wenn die Säure sehr fein verteilt und schwer abzufiltrieren ist, erwärmt man einige Zeit im Wasserbade, da die Säure kristallinisch wird. Man wäscht mit Wasser, löst in verdünnter Sodalösung, kocht auf, filtriert vom Chromoxydhydrat usw. ab und fällt mit Säure. Man kristallisiert die Dehydrocholsäure aus siedendem Wasser oder aus heißem Alkohol. Die Dehydrocholeinsäure kristallisiert man aus Alkohol durch Zusatz von Wasser bis zu beginnender Trübung um.

Eigenschaften. Dehydrocholsäure: Feine Kristallnadeln: Schmelzpunkt 228° nach *Latschinoff*, 222° nach *Lassar Cohn*[4]). Keine *Pettenkofer*sche Reaktion. Geschmack intensiv bitter ohne süßlichen Nebengeschmack. Sehr schwer löslich in Wasser, ziemlich schwer löslich in kaltem Alkohol, noch weniger löslich in Äther. Alkalisalze löslich in Wasser oder Alkohol. Baryum- und Calciumsalze schwerlöslicher in heißem als in kaltem Wasser. Dehydrocholeinsäure Kristallnadeln oder unregelmäßige Kristalle, scheinbar sechsseitige Tafeln. Schmelzpunkt 183—184°. Keine *Pettenkofer*sche

---

[1]) *Olof Hammarsten*, Über Dehydrocholalsäure, ein neues Oxydationsprodukt der Cholalsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **14**. S. 71—76. Berlin 1881.

[2]) *P. Latschinoff*, Über eine der Cholsäure analoge Säure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 18. S. 3039—3047. Berlin 1885.

[3]) *Fritz Pregl*, Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **111**. Abt. IIb. S. 1024—1071. Wien 1902.

[4]) *Lassar Cohn*, Über die Cholalsäure und einige Derivate derselben. Zeitschr. f. physiol. Chemie von *F. Hoppe-Seyler*. Bd. **16**. S. 487—504. Straßburg 1892.

Reaktion. Noch schwerlöslicher in den genannten Lösungsmitteln als die vorige Säure. Die Salze ebenfalls schwerlöslicher.

d) Darstellung von Bilian- und Isobilian- wie von Cholan- und Isocholansäure.

Bei stärkerer Oxydation liefert die Cholsäure die von *Cleve*[1]) entdeckte Biliansäure, $C_{24}H_{34}O_8$, und die ihr isomere, von *Latschinoff*[2]) entdeckte Isobiliansäure. Die Choleinsäure und die Desoxycholsäure liefern unter entsprechenden Verhältnissen die *Tappeiner*sche[3]) Cholansäure, $C_{24}H_{34}O_7$, und die isomere Isocholansäure *Latschinoffs*[4]). Zur Darstellung dieser Säuren benutzte man früher Oxydation der entsprechenden Gallensäuren mit einem Gemenge von Kaliumdichromat und Schwefelsäure in der Wärme nach den etwas abweichenden Vorschriften von *Tappeiner*, *Latschinoff*, *Bulnheim*[5]), *Mylius*[6]) u. a. Am besten ist es, das von dem Entdecker der Säure, *Cleve*, verwendete Oxydationsmittel Kaliumpermanganat zu benutzen, wobei man mit Vorteil nach dem Verfahren von *Lassar Cohn*[7]) die Manganniederschläge mit Natriumbisulfit löst. Die Isosäuren werden gleichzeitig mit den anderen Säuren gebildet, und zu ihrer Abscheidung benutzt man die Schwerlöslichkeit ihrer Baryumsalze in der Wärme. Das Verfahren bei der Darstellung ist ganz dasselbe für die Bilian- und Cholansäure, und es dürfte deshalb genügend sein, die Darstellung des einen Säurepaares — der Bilian- und der Isobiliansäure — zu beschreiben.

Zur Oxydation ist etwa die doppelte Gewichtsmenge Permanganat erforderlich, und beim Verarbeiten von z. B. 100 *g* Gallensäure (kristallalkoholfrei) braucht man also etwa 200 *g* Permanganat, von dem man unmittelbar vor dem Gebrauche eine 10%ige Lösung mit warmem Wasser bereitet. Die Cholsäure wird in Wasser mit Hilfe von Natriumkarbonat gelöst und mit Wasser zu 2% verdünnt, in dem obigen Falle also zu 5 *l*. Man kann die ganze Menge Kaliumpermanganatlösung auf einmal zumischen; es ist aber besser, nach dem Vorgange *Pregls*[8]) dieselbe portionen-

---

[1]) *P. T. Cleve*, Sur les produits d'oxydation de l'acide cholique. Bulletin de la société chimique de Paris. T. 35. p. 373—379 und 429—433 (1881).

[2]) *P. Latschinoff*, Über die Isocholansäure und Isobiliansäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 1529—1532. Berlin 1886.

[3]) *H. Tappeiner*, Über die Einwirkung von saurem chromsauren Kalium und Schwefelsäure auf Cholsäure. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **77**. Abt. II. S. 501—528. Wien 1878.

[4]) *P. Latschinoff*, Über die Isocholansäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **15**. S. 713—718. Berlin 1882.

[5]) *G. Bulnheim*, Beiträge zur Kenntnis der Gallensäuren. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **25**. S. 296—324. Straßburg 1898.

[6]) *F. Mylius*, Über die Cholsäure. IV. Mitt. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **20**. S. 1968—1989. Berlin 1887.

[7]) *Lassar Cohn*, Über Oxydationsprodukte der Cholalsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **32**. S. 683—687 (1899).

[8]) *Fritz Pregl*, Über Isolierung der Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **111**. Abt. IIb. S. 1024—1071. Wien 1902.

weise zuzusetzen. Man setzt also auf einmal 1 *l* 10%iger Permanganatlösung hinzu und läßt im Zimmer stehen. Am nächsten Tage, wenn Entfärbung stattgefunden hat, setzt man neue, 100 *g* Permanganat, in 1 *l* Wasser gelöst, hinzu. Wenn auch diese Portion entfärbt worden ist, setzt man der Sicherheit halber, wie *Pregl* vorschreibt, noch 10—20 *g* Permanganat hinzu und läßt stehen. Nachdem auch diese Portion verbraucht worden ist, versetzt man das Gemenge mit Natriumbisulfitlösung, bis eine herausgenommene Probe nach Zusatz von Schwefelsäure vollständig entfärbt wird, und fällt darauf das Ganze mit Schwefelsäure. Nach 24 Stunden trennt man die Flüssigkeit von der ausgefällten Rohsäure, löst die letztere noch feucht in kalt gesättigtem Barytwasser, erhitzt zum Sieden, wobei das Baryumsalz der Isobiliansäure sich ausscheidet, und filtriert heiß. Man konzentriert das Filtrat noch etwas, um eine vollständigere Ausscheidung der Isobiliansäure zu bewirken und fällt dann das neue Filtrat, nach dem Erkalten, mit Salzsäure. Die abgesaugte Säure löst man in siedendem Alkohol und setzt Wasser bis zur beginnenden Trübung hinzu. In derselben Weise wird sie wiederholt umkristallisiert.

Das Baryumsalz der Isobiliansäure zersetzt man im Wasserbade mit einer Lösung von Natriumkarbonat und fällt die Lösung des Natriumsalzes mit Salzsäure. Die ausgefällte Säure wird in derselben Weise wie die Biliansäure aus Alkohol umkristallisiert. Für die Darstellung der genannten Säuren aus Rohcholalsäure wie aus Mutterlaugen und Abfallprodukten der Cholsäure hat *Pregl* besondere Vorschriften geliefert.[1])

Eigenschaften: Biliansäure: Diamantglänzende Kristalle des rhombischen Systems. Schmelzpunkt 274—275° (*Pregl*). Sehr schwer löslich in kaltem Wasser, leichter löslich in kochendem, leicht löslich in Alkohol. $(\alpha)D$ in alkoholischer Lösung $= + 47{\cdot}4^0$ nach *Cleve*[2]) (und *Ångström*) $+ 48^0$ nach *Pregl* (bei $c = 3{\cdot}197\%$), Baryumsalz löslich auch in heißem Wasser. Isobiliansäure: Flache Nadeln; Schmelzpunkt 244—245° (*Pregl*). Sehr schwer löslich in Wasser; löslich in Alkohol. $(\alpha)D$ in alkoholischer Lösung $(c = 1{\cdot}73\%) = + 67{\cdot}3^0$ (*Pregl*). Baryumsalz fast unlöslich in heißem Wasser. Cholansäure: Längliche Tafeln oder flache Prismen. Schmelzpunkt 294—295° (*Pregl*). Sehr schwer löslich in Wasser; löslich in Alkohol (1 : 73 nach *Latschinoff*[3]). Baryumsalz löslich auch in heißem Wasser. Isocholansäure: Feine, perlmutterglänzende Schüppchen. Schmelzpunkt 247 bis 248° (*Latschinoff*[4]). Sehr schwer löslich in Wasser; löslich in Alkohol. Baryumsalz fast unlöslich in heißem Wasser.

---

[1]) *Fritz Pregl*, Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Klasse. Bd. **111**. Abt. IIb. S. 1024—1071. Wien 1902.

[2]) *P. T. Cleve*, Sur les produits d'oxydation de l'acide cholique. Bulletin de la société chimique de Paris. T. **35**. p. 373—379 und 429—433 (1881).

[3]) *P. Latschinoff*, Über Cholansäure und Biliansäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 474—482. Berlin 1886.

[4]) *P. Latschinoff*, Über die Isocholansäure und Isobiliansäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 1529—1532. Berlin 1886.

III. Darstellung von Taurin (und Glykokoll) aus der Galle.

Das Taurin, $C_2H_7NSO_3$, erhält man leicht aus Rindergalle, wenn man dieselbe mehrere Stunden mit verdünnter Salzsäure kocht, das von den harzigen Massen getrennte Filtrat stark konzentriert und heiß von auskristallisiertem Kochsalz und anderer Fällung filtriert. Dann verdunstet man zur Trockene, löst den Rückstand in Salzsäure von $5^0/_0$, filtriert vom ungelösten Kochsalz etc. ab und fällt das Filtrat mit dem zehnfachen Volumen Alkohol von 95 Volumprozent. Hierbei scheidet sich die Hauptmasse des Taurins aus, während das Glykokoll in Lösung bleibt.[1] Das alkoholische Filtrat verdunstet man zur Trockene, löst von neuem in wenig Salzsäure und fällt mit Alkohol, um die Reste des Taurins auszufällen. Das Taurin wird leicht durch Umkristallisieren aus heißem Wasser rein erhalten.

Die zuletzt erhaltene, von Taurinresten fast befreite, saure alkoholische Lösung, welche das Glykokoll enthält, verdunstet man zur Trockene, löst den Rückstand in Wasser, zersetzt die Lösung mit Bleihydroxyd, entbleit das Filtrat mit Schwefelwasserstoff und konzentriert stark. Die ausgeschiedenen Glykokollkristalle löst man in Wasser, entfärbt mit Tierkohle und verdunstet zur Kristallisation. Vielleicht wäre es besser, aus dem Rückstand den salzsauren Glykokolläthylester darzustellen und dann in der an anderer Stelle angegebenen Weise zu verfahren.

Will man eine Galle, sei es Rindergalle oder eine taurocholsäurereichere Galle, nicht direkt auf Taurin verarbeiten, sondern das letztere als Abfallsprodukt bei der Cholalsäurebereitung gewinnen, so verfährt man in etwas anderer Weise. Das von der Rohcholalsäure getrennte, saure, erste Filtrat, welches das Taurin enthält, konzentriert man ziemlich stark, bis eine reichlichere Kristallisation von Kochsalz stattgefunden hat. Man filtriert nun von dem Chlornatrium und anderer Fällung ab, neutralisiert mit Alkalilauge, konzentriert unter häufigem Umrühren (wegen der Salzhaut), saugt heiß von der Salzmasse ab, konzentriert von neuem, saugt ab usw., bis die Hauptmasse des Kochsalzes entfernt worden ist. Man verdunstet nun zur Trockene, zerreibt den Rückstand fein und kocht ihn ein paarmal mit Alkohol, welcher $2^0/_0$ Kalium- oder Natriumhydroxyd enthält, aus. Das Taurin wird von dem heißen, alkalihaltigen Alkohol gelöst und fällt nach Zusatz von Essigsäure (oder einer anderen Säure) zu dem Filtrate in Kristallnadeln aus. Es wird aus heißem Wasser umkristallisiert.

Eigenschaften. Farblose, oft sehr große, vier- oder meist sechsseitige Prismen mit vierseitigen Pyramiden an beiden Enden. Löslich in 15—16 Teilen kalten Wassers, leicht in heißem, unlöslich in absolutem Alkohol oder Äther. Bei Gegenwart von Alkali ist es löslicher in Wasser oder

---

[1] Vgl. *Olof Hammarsten*, Untersuchungen über die Gallen einiger Polartiere. I. Über die Galle des Eisbären. 1. Abschnitt. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32. S. 435—466 (S. 456). Straßburg 1901.

in Alkohol als sonst. Die Lösungen reagieren neutral und werden nicht von Metallsalzen gefällt. Nach dem Schmelzen mit Alkali und Nitrat reichliche Schwefelsäurereaktion.

IV. Nachweis von Gallensäuren in tierischen Flüssigkeiten.

Bei dem Nachweise der Gallensäuren muß man in letzter Hand immer mit dem Rückstande die *Pettenkofer*sche Gallensäureprobe anstellen und dabei verfährt man in folgender Weise.

Wenn man zuletzt einen festen Rückstand erhalten hat, löst man denselben, am besten in einer kleinen Porzellanschale, in wenig konzentrierter Schwefelsäure direkt unter Erwärmen oder man mischt, wenn man eine Lösung hat, ein wenig derselben mit konzentrierter Schwefelsäure unter besonderem Achtgeben darauf, daß in beiden Fällen die Temperatur nicht höher als + 60—70° C steigt. Dann setzt man unter Umrühren vorsichtig mit einem Glasstabe eine 10%ige Rohrzuckerlösung tropfenweise hinzu. Bei Gegenwart von Galle erhält man nun eine prachtvolle rote Flüssigkeit, deren Farbe bei Zimmertemperatur gewöhnlich im Laufe eines Tages mehr blauviolett wird. Die rote Flüssigkeit, mit Alkohol und Schwefelsäure passend verdünnt, zeigt in dem Spektrum zwei Absorptionsstreifen, den einen zwischen D und E, neben E und den anderen vor F. Eine ähnliche Reaktion erhält man auch mit einigen anderen Stoffen, unter welchen hier besonders Ölsäure und Phosphatide in Betracht kommen. Auf der anderen Seite kann die Reaktion, bei Gegenwart von Gallensäuren, in vielen Fällen durch Anwesenheit von durch Schwefelsäure sich zersetzende Stoffe, Farbstoffe und oxydierend wirkende Substanzen sehr beeinträchtigt werden.

Statt des Zuckers kann man auch zu der Reaktion Furfurol benutzen. Man löst das Gallensalz in Alkohol, welcher jedoch erst mit Tierkohle von Verunreinigungen befreit werden muß. Zu je 1 cm^3 der alkoholischen Lösung in einem Reagenzgläschen setzt man 1 Tropfen Furfurollösung (1:1000) und 1 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und kühlt dann wenn nötig ab, damit die Probe sich nicht zu sehr erwärme.

a) Nachweis von Gallensäuren in Blut oder serösen Flüssigkeiten.

Man fällt, ohne vorher zu neutralisieren, mit dem zwei- oder dreifachen Volumen Alkohol, filtriert ab, preßt aus und zerreibt von neuem mit Alkohol, wenn es um Blut sich handelt. Sonst ist es genügend, den Niederschlag mit Alkohol auszuwaschen. Die vereinigten alkoholischen Auszüge werden zur Trockene verdunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol sehr fein zerrieben und damit extrahiert. Das alkoholische Filtrat wird noch einmal eingetrocknet und der Rückstand mit Alkohol erschöpft. Wenn man den Rückstand des neuen Filtrates in Wasser zu lösen versucht, wird die Lösung bisweilen von Fett stark getrübt und schwer filtrierbar. Es ist deshalb besser, diesen Rückstand erst mit Äther fein zu zerreiben und das in dem Äther nicht Gelöste in Wasser zu lösen. Diese, infolge der Gegen-

wart von Seifen oft opalisierende Lösung wird filtriert und mit Bleiessig, der ein wenig Ammoniak enthält, gefällt, wobei ein Überschuß, welcher die Gallensalzfällung zum Teil lösen kann, vermieden wird. Der mit Wasser etwas gewaschene Niederschlag wird mit Alkohol in einem Gefäße mit Rückflußkühler einige Zeit gekocht und siedend heiß filtriert. Das alkoholische Filtrat wird mit einigen Tropfen Sodalösung versetzt und im Wasserbade zur Trockene verdunstet. Den Rückstand kocht man mit absolutem Alkohol aus, filtriert, konzentriert auf ein kleines Volumen und versetzt mit einem Überschuß von Äther. Bei Gegenwart von gallensauren Alkalien erhält man hierbei einen harzigen Niederschlag, der in Kristalle übergehen kann, die dann zu der *Pettenkofer*schen Probe benutzt werden.

Nach der Erfahrung des Verfassers kommt man allerdings in dieser Weise zum Ziele, wenn die Menge der Galle nicht besonders gering ist. Bei sehr kleinen Gallensäuremengen kann es sich aber ereignen, daß die gallensauren Salze, welche in Alkoholäther nicht ganz unlöslich sind, von dem Äther nicht gefällt werden und demnach verloren gehen. Auf der anderen Seite erhält man auch leicht eine Kristallisation von Alkaliacetat, welche mit kristallisierter Galle verwechselt werden kann.

Verf. hat daher für solche Fälle in etwas anderer Weise verfahren. Das alkoholische, bleihaltige Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Schwefelblei abfiltriert und in einer flachen Glasschale der freiwilligen Verdunstung überlassen. Dann wurde in wenig Alkohol gelöst, filtriert, eingetrocknet und der Rückstand zu der *Pettenkofer*schen Probe verwendet. In dieser Weise konnte in gallensäurefreien Transsudaten ein Zusatz von 1 Teil gallensaurem Salz in 100.000 Teilen Transsudat leicht nachgewiesen werden.

Aber auch dieses Verfahren ist nicht ganz einwandfrei. Erstens kann hier wie bei dem gewöhnlichen Verfahren etwas Ölseife mit ausgefällt und als Bleiseife von dem Alkohol gelöst werden, und andrerseits gibt es Phosphatide, welche eine schöne *Pettenkofer*sche Reaktion geben und deren Zersetzungsprodukte (die Fettsäuren?) das Endresultat stören können. Die Spektraluntersuchung führt in diesen Fällen zu keinem entscheidenden Resultate und Verf. hat deshalb versucht, diese Fehlerquelle in der Weise zu vermeiden, daß er die oben erwähnte, nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff zuletzt erhaltene alkoholische Lösung in ein kleines Glaskölbchen überführte, bei gelinder Wärme eintrocknete und den Rückstand mit wenigen Tropfen Benzol, welches die Fettsäuren leicht, die Gallensäuren dagegen schwer löst, behandelte. In dieser Weise kann man leicht die Fettsäuren bzw. Phospatidreste entfernen; aber leider können dabei auch die Gallensäuren, wenn deren Menge gering (1 und 2 *mg* in 100 cm^3 Serum) ist, bisweilen in Lösung gehen. Ein wie es scheint besseres Verfahren bestand darin, den Rückstand in dem Kölbchen mit Barytwasser auszukochen, das Filtrat mit Kohlensäure zu fällen, filtrieren und eintrocknen. Nach diesem Verfahren konnten leicht 2 *mg* in 100 cm^3 nachgewiesen werden, während die Kontrollprobe ohne Galle negativ ausfiel. Die Methode ist jedoch noch

nicht hinreichend geprüft worden und Verf. kann also nicht für ihre Zuverlässigkeit einstehen.

b) Nachweis von Gallensäuren im Harne.

Der direkte Nachweis von Gallensäuren im Harne kann teils nach dem Verfahren von *L. v. Udranszky*[1]) und teils nach dem von *G. Strassburg*[2]) geschehen. *v. Udranszky* prüft direkt mit der Furfurolprobe in der Weise, daß ein Tropfen Harn, mit 1 cm^3 Wasser verdünnt, erst mit einem Tropfen Furfurolwasser und dann mit 1 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure versetzt wird. Hierbei tritt nach kurzer Zeit eine schöne kirschrote Färbung auf, welche die Spektralerscheinungen der *Pettenkofer*schen Probe erkennen läßt. Die Reaktion wurde noch bei Gegenwart von 0·12% Gallensäure erhalten. *Strassburg* dagegen versetzte den Harn mit etwas Rohrzuckerlösung, tauchte einen Streifen Fließpapier in denselben ein und ließ das Papier trocknen. Betupfte er darauf den Streifen mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und ließ die letztere etwas abfließen, so entstand bei Gegenwart von Gallensäuren nach einiger Zeit eine schöne violette Färbung. Mit dieser Probe konnte er 0·03% Gallensäure nachweisen.

Diese Methoden sind nicht zu empfehlen, einerseits weil der normale Harn leicht eine Färbung gibt, welche zur Verwechslung führen kann, und andrerseits, weil diese Proben zwar bei absichtlichem Zusatz von Galle zu normalem Harn gelingen können, bei Untersuchung von stark gefärbtem oder ikterischem Harne dagegen leicht mißlingen. Will man die Gallensäuren mit Sicherheit in dem Harne nachweisen, so muß man sie zuerst womöglich isolieren, was in folgender Weise durch Ausfällung als Bleisalze geschehen kann.

Man verfährt gewöhnlich nach den Angaben von *Neukomm*[3]). Man verdampft den Harn (500 cm^3 oder mehr) im Wasserbade bis fast zur Trockene und extrahiert den Rückstand mit Alkohol von 95—96%. Das Filtrat wird wieder eingetrocknet und der Rückstand mit absolutem Alkohol gelöst. Man filtriert, verdunstet den Alkohol, löst den Rückstand in Wasser und fällt mit schwach ammoniakalischem Bleiessig unter Vermeidung von einem Überschuß. Der Niederschlag wird nach 12—24 Stunden abfiltriert, gewaschen und zwischen Fließpapier mit dem Filtrum gepreßt. Dann kocht man die Bleifällung mit siedendem Alkohol aus, filtriert siedend heiß, setzt ein wenig Sodalösung hinzu, verdunstet zur Trockene und extrahiert mit absolutem Alkohol. Diese Lösung ist bisweilen so rein und so wenig gefärbt, daß ihr Rückstand zu der *Pettenkofer*schen Probe benutzt werden kann. Gewöhnlich und besonders bei Gegenwart von nur sehr wenig Galle ist es jedoch notwendig, noch einmal mit Bleiessig zu fällen und wie oben zu verfahren. Nach dieser Methode kann man 1 Teil Gallensäure in 10.000 bis 20.000 Teilen Harn nachweisen.

---

[1]) *Ladislaus v. Udranszky*, Über Furfurolreaktionen. Der direkte Nachweis von Gallensäuren im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie von *F. Hoppe-Seyler*. Bd. **12**. S. 355 bis 376 (S. 373). Straßburg 1888.

[2]) *Gustav Strassburg*, Modifizierte *Pettenkofer*sche Probe zum Nachweis der Gallensäuren im Harne. Archiv f. d. ges. Physiol. von *E. Pflüger*. Bd. 4. S. 461—465 (1871).

[3]) *J. Neukomm*, Über die Nachweisung der Gallensäuren und die Umwandlung derselben in der Blutbahn. *Reicherts* und *Du Bois Reymonds* Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin. Leipzig. Jg. **1860**. S. 364—386.

Ist der Harn eiweißhaltig, so wird vorgeschrieben, das Eiweiß erst durch Sieden unter Essigsäurezusatz zu entfernen. Dies ist aber nach dem Verf. weder notwendig noch empfehlenswert. Mit dem Eiweiß kann nämlich ein Teil der Gallensäuren ausfallen und verloren gehen. Es ist besser, den Harn sehr schwach alkalisch zu machen, so daß das Eiweiß nicht gerinnt und dann einzutrocknen. Das Eiweiß wird dann leicht durch die Alkoholbehandlung entfernt. Bei Verarbeitung von großen Harnmengen erschwert die reichliche Menge Harnstoff die Extraktion mit Alkohol nicht unwesentlich. Für solche Fälle hat Verf. die Hauptmasse des Harnstoffes aus der alkoholischen Lösung durch einen Überschuß von Oxalsäure in Alkohol ausgefällt, das Filtrat mit einem kleinen Überschuß von Soda eingetrocknet und dann mit Alkohol behandelt.

K. Mörner[1]) konnte in dem Harn Taurocholsäure durch Dialyse und Essigsäurezusatz, wobei die Taurocholsäure in Verbindung mit dem Eiweiße ausfällt, nachweisen. Auch *Vitali*[2]) und *A. Jolles*[3]) haben die Ausfällung der Gallensäuren mit Hilfe von Eiweiß vorgeschlagen. Da aber diese Vorschläge eigentlich auf den Nachweis von Taurocholsäure sich beziehen, und da man noch nicht geprüft hat, inwieweit auch andere Gallensäuren, wie Glykocholsäure und Cholsäure, durch Eiweiß ausgefällt werden können, müssen diese Methoden noch weiter geprüft bzw. ausgearbeitet werden.

Das von *Dragendorff*[4]) angegebene Verfahren, die Gallensäuren aus dem Harne mit Chloroform, nach vorgängigem Ansäuern mit Salzsäure, auszuschütteln, gelingt nach Verf. zwar gut bei absichtlichem Zusatz von nicht zu wenig Gallensäuren zu normalem Harn. Bei Gegenwart von wenig Gallensäure und viel Farbstoff ist es weniger anwendbar und es ist nach Verf. Ansicht weniger zuverlässig als die obige Methode mit Bleifällung.

c) Nachweis von Gallensäuren in den Fäces.[5])

Man extrahiert die Fäces mit Alkohol, filtriert, dampft unter Zusatz von etwas Essigsäure auf dem Wasserbade zum Sirup ein und zieht den Rückstand mit kaltem Wasser aus. Das Ungelöste wird mit Barytwasser übergossen und nach Zufügen von etwas Wasser erwärmt. Man leitet jetzt Kohlensäure ein, erhitzt zum Sieden, filtriert heiß, erschöpft den Rückstand durch Auskochen mit heißem Wasser und dampft die vereinigten, heiß filtrierten Auszüge auf ein kleines Volumen ein. Nach dem Erkalten

---

[1]) *K. A. H. Mörner*, Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharns. Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. **6**. S. 332 bis 437 (1895).

[2]) Originalabhandlung nicht zugänglich. Referat in Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. **31**. S. 725. Wiesbaden 1892.

[3]) *Adolf Jolles*, Über eine neue Gallensäurereaktion und über den Nachweis der Gallensäuren im Harn. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 30—34. Straßburg 1908.

[4]) Originalabhandlung nicht zugänglich. Referat in Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 8. S. 102—103. Wiesbaden 1869.

[5]) Da Verf. nicht Gelegenheit gehabt hat, die hier in Frage kommenden Methoden zu prüfen, wird hier einfach das in *Hoppe-Seyler-Thierfelders* Handbuch der physiologisch und pathologisch chemischen Analyse, 7. Aufl. (1903), S. 555 beschriebene Verfahren mitgeteilt.

wird etwas Äther und dann Salzsäure hinzugefügt, gut umgerührt und eine Zeitlang stehen gelassen. Man filtriert die ausgeschiedene Cholsäure ab, wäscht mit Wasser, löst in Alkohol, dampft die alkoholische, nötigenfalls mit Tierkohle entfärbte Lösung auf ein kleineres Volumen ein und läßt zur Kristallisation stehen. Die Kristalle werden auf Cholsäure geprüft.

Dieses Verfahren bezweckt zunächst den Nachweis von Cholsäure. Zum Nachweis von dieser Säure nebst den gepaarten Gallensäuren extrahiert man die Fäces mit Alkohol, filtriert, entfernt den größten Teil des Alkohols durch Eindampfen, macht mit Salzsäure sauer, dann mit Barytwasser stark alkalisch, leitet Kohlensäure ein, erhitzt zum Kochen, filtriert heiß und kocht den Rückstand noch mehrmals mit Wasser aus. Die vereinigten Filtrate werden auf ein kleines Volumen eingedampft. Beim Erkalten scheidet sich cholsaurer Baryt ab, während glykochol- und taurocholsaurer Baryt in Lösung bleiben. Den cholsauren Baryt führt man durch Behandeln mit Salzsäure (siehe oben) in Cholsäure über. Zur Trennung der Glykochol- und Taurocholsäure kann ihr verschiedenes Verhalten gegen Bleiacetat benutzt werden. Zur Identifizierung der Säuren dienen ihre oben beschriebenen Eigenschaften und besonders die Prüfung auf Schwefel.

Da die Trennung der verschiedenen Gallensäuren, selbst wenn sie in ziemlich reinem Zustande nebeneinander vorkommen, nach der nun beschriebenen Methode nur bei Gegenwart von verhältnismäßig großen Mengen annähernd gelingt, findet Verf. es wenig wahrscheinlich, daß man bei der Untersuchung von Fäces nach dieser Methode zu guten Resultaten gelangt.

Chlorophyll und seine wichtigsten Abbauprodukte.[1]

Von **Richard Willstätter**, Zürich.

Chlorophyll ist ein kollektiver Begriff. Man versteht unter Chlorophyll oder Chlorophyllen die grünen Pigmente, welche in den kohlensäureassimilierenden Pflanzen enthalten sind.

Für die Untersuchung des Chlorophylls ist es notwendig, den Farbstoff aus der Pflanze zu isolieren. Es ist möglich, daß dabei kleine Veränderungen im Molekül des Chlorophylls stattfinden. Auch die aus den Pflanzen isolierten Pigmente bezeichne ich als Chlorophylle, wenn sie noch Magnesiumverbindungen ohne sauere und ohne basische Eigenschaften und wenn sie grün sind, d. h. wenn ihre Absorptionsspektren große Ähnlichkeit zeigen mit dem Spektrum lebender Blätter.

Das Pflanzenmaterial.

Fast alle Forscher, die über Chlorophyll arbeiten, schreiben vor, für die Darstellung von Chlorophyllösungen Pflanzenmaterial in frischem Zustand zu verarbeiten. Es wird empfohlen (z. B. von *R. Sachsse*[2], *A. Hansen*[3]), ähnlich von *A. Tschirch*[4]), frisches Gras mit Wasser auszukochen, es abzupressen und mit Alkohol in der Wärme zu extrahieren. *F. Hoppe-Seyler*[5])

---

[1]) *L. Marchlewskis* Monographie „Chlorophyll" (in *Roscoe-Schorlemmers* ausführlichem Lehrbuch der Chemie, herausgegeben von *J. W. Brühl*, Bd. 8. S. 839—913) hat im Jahre 1901 den Stand der Methodik vollständig dargestellt und die Arbeitsweise von *E. Schunck* und *L. Marchlewski* besonders berücksichtigt. Unter ausdrücklichem Hinweis auf diese Quelle der älteren Literatur teile ich deshalb in dem vorliegenden Kapitel hauptsächlich meine eigenen Erfahrungen mit.

[2]) *R. Sachsse*, Phytochemische Untersuchungen. I. Chemische Untersuchungen über das Chlorophyll. Leipzig 1880.

[3]) *A. Hansen*, Die Farbstoffe des Chlorophylls. Darmstadt 1889.

[4]) *A. Tschirch*, Untersuchungen über das Chlorophyll. Berlin 1884. — Der Quarzspektrograph und einige damit vorgenommene Untersuchungen von Pflanzenfarbstoffen. Ber. d. Deutschen botan. Gesellsch. Bd. 14. S. 76 (1896).

[5]) *F. Hoppe-Seyler*, Über das Chlorophyll der Pflanzen. I. Abh. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3. S. 339 (1879).

wäscht zur Darstellung von Chlorophyllan frisches Gras mit Äther und zieht es mit siedendem Alkohol aus. *E. Schunck* und *L. Marchlewski* [1]) gewinnen Phyllocyanin sowie Alkachlorophyll durch Extrahieren von frischem Gras mit Alkohol bei Wasserbadtemperatur. *L. Marchlewski* und *C. A. Schunck* [2]) arbeiten auf die Darstellung von reinem Chlorophyll hin durch Extrahieren der frischen Blätter von Ficus repens mit 82%igem Alkohol: sie halten diese Isolierungsweise für eine Methode, welche „Garantie dafür bietet, daß das Chlorophyll selbst chemisch nicht verändert wurde".

Meine Abänderungen der Isolierung des Chlorophylls bestehen:

1. In der Anwendung des Pflanzenmaterials in getrocknetem [3]) Zustand und gepulverter Form. [4])

Es wird auf diese Weise möglich, Chlorophyll und seine Abbauprodukte in erheblichen Mengen zu gewinnen, wie sie für die chemische Untersuchung erforderlich sind. Da die Mengen der Präparate nicht mehr einen kleinen Bruchteil, sondern einen großen Teil des in der Pflanze vorhandenen Chlorophylls repräsentieren, ist es möglich geworden, hinsichtlich der Ausbeute an Chlorophyll und seinen Derivaten Angaben zu machen, die bisher in der Literatur fast ganz gefehlt haben.

Der Verlust an Chlorophyll durch die Trocknung der Pflanzen erweist sich als gering: der quantitative kolorimetrische Vergleich ergibt z. B., daß die Ausbeute an Chlorophyll im alkoholischen Extrakt getrockneter Brennnesselblätter 95·7% und aus getrockneten Galeopsisblättern 94·5% beträgt vom Chlorophyll, das die frischen Blätter an Alkohol abgeben. [5])

Als das geeignetste Ausgangsmaterial erweist sich für die meisten Abbauprodukte das Kraut der Brennessel (Herba Urticae), das schön getrocknet zu billigem Preise käuflich ist. [6]) Auch Gras von reinem Parkrasen ist ein gutes Ausgangsmaterial, aber es ist schwerer schön grün zu trocknen als Brennesseln.

100 *g* frische Brennesselblätter geben lufttrocken 24—25 *g*.

Die Pflanzenmehle enthalten gewöhnlich noch etwa 7% Feuchtigkeit.

Bei der Verarbeitung von getrockneten Pflanzen, wie überhaupt bei jeder Isolierung von Chlorophyll aus den Pflanzen, muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß das empfindliche große Chlorophyllmolekül irgend welchen Veränderungen anheimfällt. Darum ist es bei der Verarbeitung von getrocknetem Pflanzenmaterial geboten, jedes wichtige Resultat auch an frischen Pflanzen zu bestätigen. So gelingt es beispielsweise, aus frischen

---

[1]) *E. Schunck* und *L. Marchlewski*, Zur Chemie des Chlorophylls. Ann. d. Chemie. Bd. **278**. S. 329 (1894) und Ann. Bd. **284**. S. 81 (1894).

[2]) *L. Marchlewski* und *C. A. Schunck*, Zur Kenntnis des Chlorophylls. Journ. für prakt. Chemie. [2.] Bd. **62**. S. 247 (1900).

[3]) *R. Willstätter*, Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Ann. d. Chemie. Bd. **350**. S. 62 und 65 (1906).

[4]) Das Mahlen der getrockneten Blätter soll in einer steinernen Mühle geschehen; Berührung mit Metall ist zu vermeiden.

[5]) Unveröffentlichte Beobachtung von *R. Willstätter* und *M. Utzinger*.

[6]) Für die Tonne gemahlenes Brennesselkraut habe ich im Sommer 1908 M. 750 bezahlt.

Blättern von Galeopsis Tetrahit das nämliche kristallisierte Chlorophyll zu erhalten[1], zu deren Gewinnung die getrockneten Blätter dieser Pflanze gedient haben.

2. In der Verarbeitung des Pflanzenmaterials in der Kälte, sei es durch Extrahieren oder Perkolieren.

3. In dem Vergleich des Chlorophylls der verschiedenen Pflanzen.

Nachdem bestimmte chemische Merkmale des Chlorophylls aufgefunden waren, hat es sich gezeigt[2], daß die grünen Pigmente nicht bei allen Pflanzen die gleiche Zusammensetzung besitzen. Es erscheint demnach als eine wichtige Aufgabe der Pflanzenchemie, die Chlorophylle aus allen Gruppen des Pflanzenreiches zu vergleichen.

Dem Chlorophyll aller Pflanzenklassen ist der Gehalt an komplex gebundenem Magnesium gemeinsam. Den Alkohol Phytol habe ich als Bestandteil des Chlorophylls in vierzig verschiedenen Pflanzenfamilien angetroffen.

Gewinnung der Rohchlorophyllösungen.

Die Blättermehle werden unter Vermeidung jeder Berührung mit Metall bei gewöhnlicher Temperatur mit Alkohol, Holzgeist, Äther oder Aceton ausgezogen. Äther extrahiert den Farbstoff langsamer, namentlich das kristallisierte Chlorophyll ist infolge seiner geringen Löslichkeit in Äther viel schwieriger mit Äther zu extrahieren als mit Alkohol. Petroläther entzieht dem Material nur Spuren von Chlorophyll.

In den Rohchlorophylllösungen sind außer Chlorophyll die gelben Pigmente der Blätter (Carotin, Xanthophyll) sowie Fette, Wachse und andere farblose Substanzen enthalten: der trockene Rückstand des Doppelextraktes aus 1 *kg* Brennesseln beträgt ca. 35 *g*.[3])

1 *kg* Blättermehl wird mit zwei Litern Lösungsmittel in einer Stöpselflasche in der Kälte extrahiert, was beim Schütteln an der Maschine höchstens einige Stunden beansprucht. Der Extrakt wird an der Pumpe abgesaugt, das Pulver auf der Nutsche scharf abgepreßt und so lange nachgewaschen, bis das Volumen des Filtrates den angewandten zwei Litern gleichkommt.

Bei präparativen Arbeiten in größerem Maßstab stelle ich stärkere Extrakte nach zwei Methoden dar, entweder sogenannte Doppelextrakte[4], indem die alkoholischen oder ätherischen Auszüge aufs neue zum Erschöpfen von Blättermehl dienen, oder Perkolate mit verschiedenen Lösungsmitteln.

1. Doppelextrakte.

Je 50 *kg* mittelfeines Mehl aus trockenem Brennesselkraut oder Gras schüttelte ich mit 75 *l* Alkohol von 96% in einem Dutzend 12 *l*-Pulver-

[1]) Beobachtung von *R. Willstätter* und *E. Hug.*

[2]) *R. Willstätter* und *M. Benz,* Über kristallisiertes Chlorophyll. Ann. d. Chemie. Bd. **358**. S. 267 (1908).

[3]) Bestimmung von *R. Willstätter* und *E. Hug.*

[4]) *R. Willstätter,* Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Ann. d. Chemie. Bd. **350**. S. 65 (1906).

flaschen zu einem gleichmäßigen Brei an. Die Extraktion war nach 24-stündigem Stehen beendigt, namentlich wenn die Füllung durch häufiges Rollen der Flaschen auf einer dicken Filzunterlage und durch wiederholtes kräftiges Durchschütteln recht gründlich vermischt worden war. Die Lösung wurde dann in drei Portionen an der Pumpe scharf abgesaugt auf einer großen Nutsche aus Steinzeug, die man mit einer Platte zudeckt. Da das abgepreßte Pulver pro Kilogramm durchschnittlich 0·8 *l* Extrakt zurückhält, war zur Gewinnung des Extraktes Nachwaschen mit 40 *l* Alkohol erforderlich: der Waschalkohol verdrängte den Extrakt aus dem Pulver, ohne ihn zu verdünnen. So wurden 75 *l* einfachen Extraktes erhalten. Um das Pulver vollkommen auszulaugen, diente dann ein zweites Nachwaschen mit etwa 20 *l* Alkohol; dieser Waschalkohol lieferte noch eine sehr verdünnte Chlorophyllösung, die einfach zum Ansetzen von frischem Pulver Verwendung fand.

Mit diesem ersten Extrakt wurde eine zweite Charge von 50 *kg* Brennnesselpulver ausgezogen, und zwar in etwa 48 Stunden. Das Absaugen und Nachwaschen erfolgte in der nämlichen Weise, nur war es lohnend, für das letzte Nachwaschen des Doppelextraktes die doppelte Menge Alkohol anzuwenden, also etwa 40 *l*. Ich erhielt demnach aus 100 *kg* Blätter mit 155 *l* Alkohol 75 *l* Doppelextrakt und weitere 60 *l* Waschalkohol wurden chlorophyllhaltig wiedergewonnen und zur Darstellung des nächsten Extraktes verwendet.

2. Perkolate.[1]

Ich verwende gläserne Perkolatoren von 1/2 und 1 *l* Inhalt bis zu solchen von 12 und von 25 *l* Inhalt.[2] Die Figur 48 zeigt die Perkolation mit vier Apparaten von je 25 *l* Inhalt, und zwar in der Phase des Mazerierens.

Große Perkolatoren aus Steinzeug sind haltbarer und billiger als die gläsernen Apparate, aber sie sind wegen ihres bedeutenden Gewichtes schwer zu handhaben.

Vor dem Einfüllen des Pflanzenpulvers in die Perkolatoren wird das trockene Mehl mit Alkohol (0·3 *l* pro Kilogramm) angefeuchtet und gut vermischt und in hölzernen Bottichen drei bis vier Stunden lang zugedeckt stehen gelassen. Nach dieser Zeit läßt man das Pulver durch ein Roßhaarsieb von ca. 1·5 *mm* Maschenweite fallen und füllt es in die Perkolatoren ein. Der Boden der Gefäße wird zunächst mit einer dünnen Schicht Watte bedeckt, die als Filter wirkt. Das Material muß ziemlich lose, aber möglichst gleichmäßig eingefüllt und leicht gestampft werden. Ist es zu fest gedrückt, so tritt leicht Verstopfung ein; andererseits, wenn die Füllung ungleichmäßig und zu locker hergestellt ist, findet der Alkohol Kanäle, durch welche er ohne zu extrahieren abläuft. Die untere Grenze des herabsickernden Lösungsmittels soll einen fast horizontalen Kreis bilden.

[1] Unveröffentlicht.

[2] Die Perkolatoren sind zu beziehen von den Glashüttenwerken von Poncet, Aktiengesellschaft, Berlin.

Zur Perkolation und zum Nachwaschen dienen ca. 2 *l* Alkohol pro Kilogramm Brennesselpulver. Bei den Perkolatoren mit 3 *kg* Füllung (10—12 *l* Wasserinhalt) wird einfach eine Flasche mit 6 *l* Inhalt umgestülpt und auf den oberen Rand des Perkolators gesetzt; sie entleert sich in dem Maße, als der Alkohol nach unten abfließt. Für die großen Perkolatoren (gefüllt mit ca. 9 *kg* Brennesseln) werden Flaschen mit je 17 *l* Alkohol hoch auf-

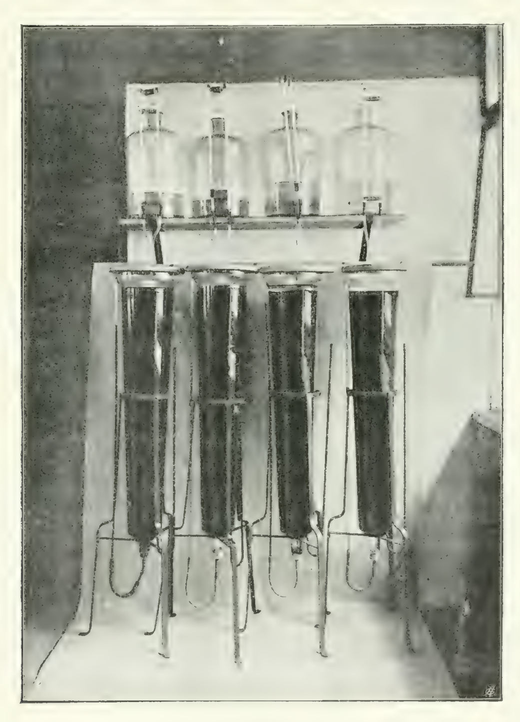


Fig. 48.

gestellt. Sie tragen aufgeschliffene Helme, eine Glasröhre geht durch den Helm fast bis auf den Boden der Flasche, eine zweite Röhre mündet im Helme; beide führen in den Perkolator bis dicht über die Füllung: auf diese Weise wird der Zufluß von Alkohol automatisch reguliert. Den Perkolator verschließt man zur Vermeidung der Feuchtigkeitsanziehung mit einer geschliffenen Glasplatte, die mit einem Schlitz versehen ist.

Gewöhnlich dauert es 12—15 Stunden, bis die ganze Füllung der großen Perkolatoren von Alkohol durchdrungen ist; ich setze dann das

Mazerieren, indem der Perkolator mit einem Steigrohr verbunden wird, noch weitere zehn Stunden fort. Danach nimmt man das Steigrohr weg und läßt das Perkolat in eine Flasche abtropfen. Anfangs ist der Ablauf höchst konzentriert, er wird immer verdünnter und es ist zweckmäßig, die Vorlage zu wechseln, wenn aus den großen Perkolatoren 0·6—0·7 *l* Auszug pro Kilogramm Material abgelaufen ist, d. i. ungefähr nach 24 Stunden. In die zweite Vorlage wird unter Saugen mit der Vakuumleitung in 8 bis 10 Stunden noch ein Nachlauf geleitet, welcher pro Kilogramm Pflanzenmehl 0·30—0·45 *l* beträgt. Dieser Nachlauf dient zum Ansetzen der nächsten Charge.

Beispiel. Die Charge von 36 *kg* Pulver wird mazeriert mit 10 *l* Alkohol und in den 4 Apparaten perkoliert mit 16 *l* Nachlauf und 47 *l* frischem Sprit: in die I. Vorlage fließen 23 *l* Perkolat freiwillig ab, in die Vorlage II werden 16 *l* Nachlauf abgesaugt. Das Mehl hält 34 *l* Alkohol zurück, die man daraus abdestillieren kann.

Quantitative Chlorophyllbestimmung.[1]

Für die quantitative Analyse der Rohchlorophyllösungen, der Chlorophyllinsalze und einiger anderer Präparate habe ich einfache kolorimetrische Methoden ausgearbeitet, die übrigens nicht die Genauigkeit spektralkolorimetrischer Methoden anstreben und erreichen.

Eine große Schwierigkeit bei dieser Kolorimetrie besteht darin, daß oft Lösungen von verschiedenen Farbnuancen zu vergleichen sind, z. B. Lösungen von Chlorophyll mitsamt den gelben Begleitern und andererseits Lösungen von reinem Chlorophyll. Diese Schwierigkeit beseitige ich mittelst einer „Verseifungsmethode": man verseift die carotinhaltige Lösung, entfernt die gelben Farbstoffe durch Ausäthern und verwendet dann die Lösung von Chlorophyllinalkali, am besten die frisch bereitete alkoholische Lösung, da die wässerige unbeständig ist.

Störende Nuancendifferenzen treten auch auf, wenn die Chlorophylle in den Lösungen bei längerer Versuchsdauer oder beim Aufbewahren Veränderungen erlitten haben: der kolorimetrische Vergleich wird dann ungenau.

1. Relative Gehaltsbestimmung.

a) Von Extrakten oder Perkolaten.

Um zu ermitteln, wieviel Prozent des aus einem Pflanzenmaterial extrahierbaren Chlorophylls in eine Lösung übergegangen ist, vergleicht man diese mit dem quantitativen Auszug einer gewogenen kleinen Menge des nämlichen Materials. Dabei gibt es keine Nuancendifferenzen.

Neben der Verarbeitung eines Blättermehles in großem Maßstab beschicke ich z. B. einen kleinen Perkolator mit 100 oder 200 *g* desselben Pulvers und perkoliere es mit einem Überschuß von Alkohol erschöpfend,

[1]) Originalmitteilung von *R. Willstätter* und *M. Utzinger.*

also bis der Ablauf farblos ist. Für den kolorimetrischen Vergleich verdünne ich die Chlorophyllösungen so, daß 1 *kg* Blattpulver 200 *l* Extrakt gibt.

Der Doppelextrakt aus 60 *kg* Brennesseln enthielt 66·6%, das Perkolat aus 36 *kg* (angesetzt mit dem Nachlauf einer vorangehenden Charge) enthielt 79·3%, der Nachlauf dieses Perkolates 10·9% des extrahierbaren Chlorophylls.

Das Perkolat einer Charge von nur 3 *kg* Brennesseln enthielt 87·8%, der einfache Extrakt aus 2 *kg* Galeopsis mit 4 *l* Alkohol enthielt 90·0% der möglichen Ausbeute.

Diese Betriebskontrolle hat sich als nützlich erwiesen; sie zeigte z. B. an, daß bei mehreren Doppelextrakten aus je 30 *kg* Brennesseln die Ausbeute auf 55% der isolierbaren Menge zurückgegangen war infolge zu geringer Sorgfalt beim Vermischen der Flaschenfüllungen.

Diese relative Wertbestimmung genügt auch oft für eine annähernde absolute Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von Lösungen, nachdem einmal Erfahrungen über den Chlorophyllgehalt verschiedener Pflanzenmaterialien gewonnen sind.

Auf dieselbe Weise mit Hilfe quantitativer Auszüge gewogener Mengen vergleiche ich auch verschiedene Lieferungen oder Ernten derselben Pflanze, ferner frische und getrocknete Blätter der nämlichen Pflanze und auch die Blätter von verschiedenen Pflanzen.

b) Von Chlorophyllinsalzen.

Aus den Rohchlorophyllösungen scheidet sich beim Versetzen mit Ätzkali Chlorophyllinkalium ab; nach der Verseifungsmethode wird bestimmt, welcher Bruchteil des Chlorophylls ausgeschieden ist.

Das Perkolat von 2 *kg* Brennesseln gab 7·5 *g* Chlorophyllinkalium; 0·5% davon werden zu 2 *l* aufgelöst[1]) (also Kaliumsalz aus 1 *kg* Brennesseln in 200 *l*). Andrerseits war vom Perkolat 0·05% reserviert worden (entsprechend 1 *g* Brennesseln). Diese Probe wurde mit alkoholischer Kalilauge versetzt und stehen gelassen; an der Wand des Gefäßes setzte sich braunes Harz ab, wovon man die Flüssigkeit unter Nachwaschen mit Alkohol dekantierte. Die alkoholisch-alkalische Lösung wurde dann mit Wasser verdünnt und durch Ausäthern von gelben Farbstoffen befreit. Schließlich verdünnte ich die Lösung für den kolorimetrischen Vergleich auf 200 cm^3, und zwar mit Alkohol. Der Vergleich ergab, daß in Form von Chlorophyllinkalium 37% des Chlorophylls aus dem Perkolat ausgefallen waren; die Mutterlauge vom Kaliumsalz enthielt noch 55% vom ursprünglich vorhandenen Chlorophyll. Der Chlorophyllverlust betrug 8%; er ist dadurch bedingt, daß das Harz, wovon bei der Gewinnung von Chlorophyllinsalzen dekantiert wird, nicht ganz frei von Chlorophyll ist und dadurch, daß das zähe Chlorophyllinkalium nicht vollständig von den Gefäßwänden gesammelt werden kann.

[1]) Oder eine beliebige abgewogene Menge darauf umgerechnet.

2. Absolute Gehaltsbestimmung.

Diese wird durch den Vergleich mit dem reinen kristallisierten Chlorophyll (in exsikkatortrockenem Zustande) ausgeführt und drückt den Chlorophyllgehalt eines Pflanzenmateriales, einer Lösung oder eines Präparates durch die kolorimetrisch äquivalente Menge von kristallisiertem Chlorophyll aus.

a) Bei den Pflanzen, welche überwiegend oder reichlich das kristallisierte Chlorophyll liefern, ermöglicht der kolorimetrische Vergleich mit gewogenen Mengen des reinen Farbstoffes die ziemlich genaue Bestimmung des Chlorophyllgehaltes. Um die in der Pflanze enthaltenen gelben Begleiter zu beseitigen, wird die Verseifungsmethode angewendet.

Eine geeignete Konzentration der Chlorophyllösung erhält man mit 0·025 *g* kristallisiertem Chlorophyll in 1 *l* Alkohol. Der erschöpfende Auszug von trockenem Galeopsiskraut (200 *l* Perkolat aus 1 *kg*) stimmte nach dem Verseifen und Wegäthern der gelben Pigmente in der Nuance gut überein mit dem unverseiften Chlorophyll. Der Vergleich ergab, daß das verseifte Chlorophyll aus 1 *kg* Galeopsis (mit 6·6% Feuchtigkeitsgehalt) 5·42 *g* unverseiften Chlorophylls farbäquivalent war.

Strenger richtig ist es, für den Vergleich die beiden Chlorophylllösungen zu verseifen.

1 *kg* frische Blätter ohne Stiele (Trockengewicht 23·2%) von Galeopsis tetrahit (im Mai gesammelt), von den gelben Begleitern durch Verseifung befreit und mit verseiftem kristallisierten Chlorophyll verglichen, enthielt 1·7 *g* Chlorophyll. Also Chlorophyllgehalt 0·73% des Trockengewichtes.

Es wird indessen, wie der nachstehende Versuch zeigt, nur ein ganz unerheblicher Fehler begangen, wenn für den Vergleich das verseifte kristallisierte Chlorophyll durch das unverseifte ersetzt wird; und das ist viel bequemer in Anbetracht der Zersetzlichkeit von Chlorophyllinsalzlösungen.

0·05 *g* Chlorophyll wurde mit 4 cm^3 konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge einige Minuten in der Achatschale verrieben, dann mit wenig Wasser aufgenommen[1]) und mit Alkohol verdünnt. Die Lösung besaß 98% vom Farbwert des unverseiften Chlorophylls und stimmte in der Nuance gut mit letzterem überein. Bei anderer Ausführung des Versuches (weniger Alkali, längere Dauer der Verseifung) kam es vor, daß die Übereinstimmung in der Nuance weniger befriedigend war.

b) Bei Auszügen aus Pflanzen, die amorphes Chlorophyll enthalten, wird der Chlorophyllgehalt gleichfalls durch die kolorimetrische äquivalente Menge von kristallisiertem Chlorophyll quantitativ definiert.

Das amorphe Chlorophyll besteht zu fast einem Drittel (ca. 31%) aus Phytol; sein Molekulargewicht, das ich ungefähr 955 berechne, also auch seine Menge ist um etwa 38% größer als die äquivalente Menge von kristallisiertem Chlorophyll (Molekulargewicht = ca. 691).

---

[1]) Diese Lösung färbte Äther beim Umschütteln nicht an. Wurde aber kristallisiertes Chlorophyll zuerst in Alkohol gelöst und dann verseift, so ließ sich etwas grüne Substanz ausäthern.

Mit dem unverseiften kristallisierten Chlorophyll werden z. B. die quantitativen Auszüge aus Brennesseln verglichen, die nach der Verseifungsmethode von gelben Begleitern befreit worden waren; die Übereinstimmung der verglichenen Lösungen in der Farbnuance war sehr gut.

Das Chlorophyll aus 1 *kg* käuflichem Brennesselkraut (Halle a. S., Sommer 1908: Feuchtigkeitsgehalt 8%) war äquivalent 4·4 *g* kristallisierten Chlorophylls. Das Chlorophyll aus 1 *kg* reiner trockener Brennesselblätter, welche ich in Zürich im Sommer 1908 selbst gesammelt habe, war äquivalent 5·8 *g* kristallisiertem Chlorophyll; der Gehalt an amorphem Chlorophyll war also 8 *g*.

1 *kg* frische Brennesselblätter (gesammelt in Zürich im Oktober 1908), welche 25·6% Trockensubstanz mit 96% vom ursprünglichen Chlorophyllgehalt lieferten, enthielten Chlorophyll, das äquivalent war 1·6 *g* kristallisierten Chlorophylls, d. i. also 2·2 *g* amorphes Chlorophyll (Phytolesterchlorophyll). Der Chlorophyllgehalt war also 0·856% von der Trockensubstanz dieser Blätter.

c) Bei Chlorophyllinsalzen. Die aus den Rohchlorophyllösungen abgeschiedenen Chlorophyllinsalze stellen nicht reine Chlorophyllinsubstanz dar, sondern sie sind mehr oder weniger mit farblosen Produkten verunreinigt. Der Wert dieser Chlorophyllinsalze wird quantitativ bestimmt durch das kolorimetrische Äquivalent von kristallisiertem Chlorophyll. Der Vergleich wird am genauesten, wenn das letztere dafür verseift wird.

0·025 *g* kristallisiertes Chlorophyll werden direkt mit konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge verrieben und kurze Zeit stehen gelassen. Dann wird das Verseifungsprodukt mit Wasser aufgenommen und mit Alkohol auf 1 *l* verdünnt.

Die Chlorophyllinsalze werden fein gepulvert und zur Konstanz getrocknet. Für den Vergleich löst man 0·25 *g* in 100 cm^3 Wasser auf und verdünnt 10 cm^3 von dieser Lösung mit Alkohol zu 1 *l*.

Ich fand gute Präparate von Chlorophyllinkalium, aus Brennesselauszügen gewonnen, meistens 40—50%ig. Von dem unter 1 *b* angeführten Chlorophyllinkalium entsprach 1 *g* : 0·44 *g* kristallisierten Chlorophylls.

Kristallisiertes Chlorophyll.

Kristalle von Chlorophyll hat *J. Borodin*[1]) unter dem Mikroskop entdeckt, als er mikroskopische Schnitte grüner Blätter verschiedener Pflanzen mit Alkohol betupfte und die Präparate unter Deckgläsern langsam austrocknen ließ. *N. A. Monteverde*[2]) hat später das kristallisierte Chlorophyll durch die Beschreibung seines Spektrums und seiner Löslichkeitsverhältnisse genauer gekennzeichnet.

[1]) *J. Borodin,* Über Chlorophyllkristalle. Sitzungsberichte der botanischen Sektion der St. Petersburger Naturforscher-Gesellschaft. Botanische Zeitung. Bd. **40**. S. 608 (1882).

[2]) *N. A. Monteverde,* Das Absorptionsspektrum des Chlorophylls. Acta horti Petropolitani. Vol. **13**. Nr. 9. p. 123 (1893).

Nachdem diese Angaben lange Zeit keine Beachtung und keinen Glauben gefunden hatten, ist es mir[1] vor kurzem (gemeinsam mit *M. Benz*) gelungen, eine Methode auszuarbeiten, nach welcher sich diese wunderschöne Substanz rein und in beliebiger Menge gewinnen läßt.

Während aber *Borodin* angibt, daß ihm unter 776 Pflanzenarten, die mikroskopisch untersucht wurden, 190 Arten Chlorophyllkristalle in größerer oder kleinerer Menge geliefert haben und während auch *Monteverde* den kristallisierten Farbstoff in Pflanzen aus einer Anzahl ganz verschiedener Familien angetroffen hat, finde ich nur einige Tubifloren für die Gewinnung des kristallisierten Chlorophylls brauchbar. Von vielen Pflanzen, mit welchen Versuche ausgeführt wurden, hat sich Galeopsis tetrahit L. als besonders geeignet für die Gewinnung des kristallisierten Chlorophylls in größerem Maßstab erwiesen.

Das Kraut von Galeopsis habe ich kurz vor und während der Blütezeit gesammelt. Die Blätter werden von den Stengeln getrennt, getrocknet und mit der Steinmühle gemahlen. Zum Ausziehen des Chlorophylls eignet sich am besten Alkohol; Äther extrahiert das kristallisierte Chlorophyll nur recht träge und unvollständig. Bei der Gewinnung der alkoholischen Extrakte ist der Zusatz von geschlämmter Kreide oder von Magnesia carbonica zur Neutralisation von Pflanzensäuren empfehlenswert.

10 *kg* Mehl der Galeopsisblätter werden mit einem Zusatz von Schlämmkreide in Stöpselflaschen mit 20 *l* 96%igem Alkohol unter häufigem Umschütteln 2—3 Tage lang ausgezogen, dann auf der Steinzeugnutsche abgesaugt und mit 8 *l* Alkohol nachgewaschen. Aus der alkoholischen Lösung des Rohchlorophylls mache ich eine ätherische durch Vermischen des Extraktes mit 20—25 *l* Äther und Hinzufügen der zur Beseitigung der Hauptmenge des Alkohols gerade zweckmäßigen Menge Wasser; das sind etwa 60 *l* Wasser mit $^1/_4$ *l* gesättigter Kochsalzlösung.

Die Ätherlösung ist zwar gewöhnlich frei von Pflanzensäuren, aber sie enthält noch als eine sehr unangenehme und recht schwierig zu entfernende Verunreinigung eine farblose, indifferente, schleimige Substanz. Sie verursacht, sobald man den Alkohol aus der Ätherlösung vollständig herauszuwaschen versucht, hartnäckige Emulsionen. Zur Beseitigung des Schleimes ist es nützlich, die Lösung eine Reihe von Malen stundenlang mit Klärmitteln an der Maschine zu schütteln; ich wende 3—4mal ein ganzes Kilo Talk oder Kieselgur an. Ein Rest der Verunreinigung bleibt allerdings auch dann noch im Äther zurück, aber er verursacht beim Ausschütteln mit Wasser keine lästigen Emulsionen mehr und wird dabei nahezu entfernt. Die Lösung wird 5mal mit je 20 *l* Wasser durchgeschüttelt und ihr Volumen bei allen Operationen durch Nachfüllen von Äther unvermindert erhalten. Schließlich engt man die ätherische Lösung im Wasserbade auf 3—4 *l* ein. Gegen Ende des Eindampfens beginnt oft

[1] *R. Willstätter* und *M. Benz*, Über kristallisiertes Chlorophyll. Ann. d. Chem. Bd. 358, S. 267 (1908).

die Flüssigkeit infolge der Ausscheidung von Kristallen zu stoßen. Die Hauptmenge des Chlorophylls kristallisiert dann beim Stehen in einigen Stunden aus; es wird abfiltriert und auf dem Filter zur Beseitigung anhaftender Mutterlauge, namentlich zur Befreiung von den gelben Begleitern ausgewaschen, bis die Waschflüssigkeit rein grün abläuft. Die ätherische Mutterlauge liefert bei stärkerem Einengen noch weitere Kristallisationen, die an Reinheit ein wenig hinter der Hauptportion zurückstehen.

Die Ausbeute schwankte bei verschiedenen Ernten, sie betrug z. B. 17 *g*, wovon 13 *g* als erste Kristallisation isoliert waren. Beim Verarbeiten kleinerer Mengen ist diese Ausbeute aber leicht zu übertreffen; aus 1 *kg* Galeopsis kann man 2—2·5 *kg* kristallisiertes Chlorophyll isolieren, d. i. annähernd die Hälfte des Farbstoffgehaltes der Pflanze. Der Reinheitsgrad der kristallisierten Substanz ist von der Sorgfalt abhängig, mit der die beschriebenen Reinigungsoperationen ausgeführt werden. Die Präparate erweisen sich fast immer vollkommen frei von gefärbten Verunreinigungen (von amorphem Chlorophyll, von Carotin und von Xanthophyll), aber sie enthalten öfters noch etwas farblose Substanz. Beim Wiederaufnehmen der Kristalle mit Äther (1 *g* löst sich träge in 300 cm^3) blieb diese Beimischung zurück und aus der abermals eingeengten Lösung kristallisierte das Chlorophyll ohne nachweisbare Verunreinigung. Nicht selten war auch schon das Rohprodukt vollkommen rein.

Viel einfacher, aber unrein läßt sich das Chlorophyll abscheiden, indem man den Alkoholauszug mit Petroläther vermischt und dann mit Wasser versetzt. Während bei der Trennung der Schichten der Petroläther das amorphe Pigment aufnimmt, scheidet sich das kristallisierbare in festem Zustand mit gelben und farblosen Beimischungen aus.

Reinigung. Durch Auflösen in Alkohol, Vermischen mit Äther und Herauswaschen des Alkohols mit Wasser erhält man leicht übersättigte ätherische Lösungen, aus denen sich das Chlorophyll schnell abscheidet.

In kleinerer Menge läßt sich das Chlorophyll sehr gut umkristallisieren, und zwar besonders aus Methylal; schwerer gelingt das Umkristallisieren größerer Mengen, da sich die Substanz in Lösungen, namentlich beim Erhitzen, leicht verändert und ihr Kristallisationsvermögen einbüßt; in alkoholischer Lösung tritt schon bei gewöhnlicher Temperatur bei längerem Stehen Veränderung ein. Zur Kristallisation aus Methylal wird die Lösung bei Siedetemperatur rasch hergestellt und sogleich stark eingeengt. Aus Äther kann man das Chlorophyll umkristallisieren, indem man mit einem Überschuß des Lösungsmittels aufnimmt und zu starker Konzentration abdampft.

Eigenschaften. Das kristallisierte Chlorophyll bildet scharf begrenzte sechseckige und gleichseitig dreieckige Täfelchen, die sehr wahrscheinlich dem hexagonalen System angehören und trigonal hemiedrisch zu sein scheinen. Die Fig. 49 stellt die Form eines typischen Rohproduktes, die Fig. 50 ein aus Methylal umkristallisiertes Präparat in schwacher Vergrößerung dar.

Die Kristalle zeigen blauschwarze Farbe und den lebhaftesten metallischen Glanz und besonders im Sonnenlicht wunderbare Reflexe. Das Pul-

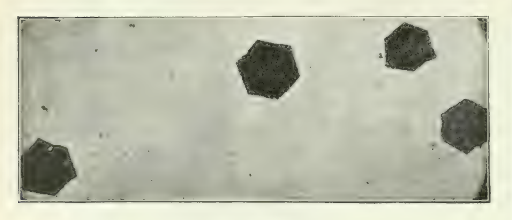


Fig. 49.



Fig. 50.

ver ist dunkelgrün. Die Kristalle sind weich und haften an Glas und Papier. Sie besitzen keinen Schmelzpunkt, beim Erhitzen tritt unter Aufblähen Zersetzung ein.

Das kristallisierte Chlorophyll ist leicht löslich in absolutem Alkohol, Holzgeist und in Aceton, ziemlich schwer in Äther, viel beträchtlicher in Methylal, nämlich 1 *g* beim Kochen in 40—45 *cm*³, kalt nur wenig schwerer. Es löst sich reichlich in Chloroform, namentlich beim Erwärmen (1 *g* in ca. 16 *cm*³),

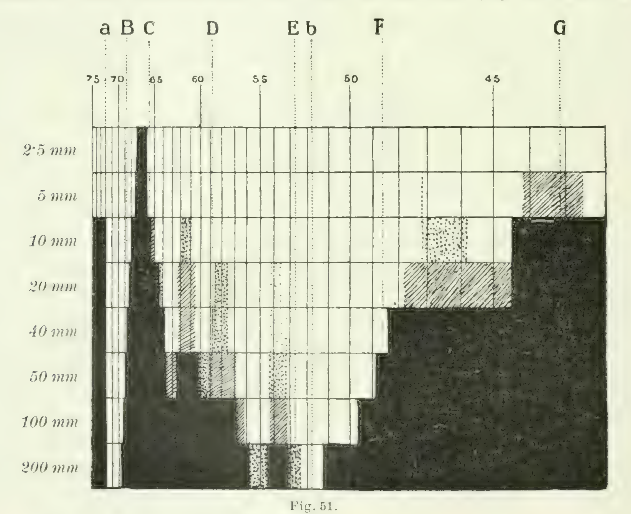


Fig. 51.

verändert sich aber leicht darin. In Benzol ist es heiß ziemlich leicht, kalt schwer löslich, in Petroläther unlöslich.

Die Lösungen besitzen rein grüne Farbe und starke rote Fluoreszenz. Sie zeigen im sichtbaren Spektrum (Fig. 51) 6 Absorptionsbänder mit der Reihenfolge der Intensität: I, VI, V, II, III, IV.

0·1 *g* Chlorophyll in 5 *l* Alkohol.

Schicht in *mm*	1	10	40
Band I λ*	672 — — 658	680 — 656 — — 650	688 — 638
„ II λ	—	619 . . 610	622 — — 605
„ III λ	—	—	589 . . 575
„ IV λ	—	—	542 . 531
„ V λ	—	472 . . 458	484 —
„ VI λ	—	446 —	—
Endabsorption λ	—		—

* Die Zahlen der Wellenlängen (in μμ) werden mit den Zeichen verbunden: — für sehr dunkel, — — für ziemlich dunkel, . . . weniger geschwächt, . . wenig geschwächt, . sehr wenig geschwächt.

Zusammensetzung: Das Chlorophyll hinterläßt 5·66% Asche von reiner Magnesia. Die Analyse umkristallisierter Präparate (exsikkatortrocken) ergab folgende Mittelwerte:

	Gefunden	Berechnet für $C_{38}H_{42}O_7N_4Mg$
C	65·83	66·01
H	6·15	6·13
N	8·24	8·13
Mg	3·40	3·53
O	16·38	16·20

Amorphes Chlorophyll.

Das Chlorophyll der meisten Pflanzen unterscheidet sich von dem beschriebenen durch den Mangel des Kristallisationsvermögens und durch seine Löslichkeitsverhältnisse: es ist in Äther und auch in Petroläther sehr leicht löslich. Dieser Unterschied könnte bedingt sein durch geringere Reinheit des amorphen Chlorophylls. Aber ich finde einen sicheren Unterschied darin, daß das kristallisierte Chlorophyll kein Phytol enthält, das nicht kristallisierende, leicht lösliche hingegen ein Ester des Phytols ist.

Gemeinsam ist dem amorphen und dem kristallisierten Chlorophyll der Gehalt an komplex gebundenem Magnesium.[1] Entfernt man aus beiden

[1] Daß Chlorophyll eine Magnesiumverbindung ist, wurde in meiner Untersuchung „Zur Kenntnis des Chlorophylls" (Ann. d. Chem. Bd. **350**, S. 48 [1906]) gefunden. Die Monographie „Chlorophyll", in welcher *L. Marchlewski* im Jahre 1901 (in *Roscoe-Schorlemmer*, herausgegeben von *J. W. Brühl*, Bd. 8. S. 839—913) unsere Kenntnis von dem

das Metall, so entstehen Umwandlungsprodukte, die keine Asche geben. Phäophorbin und Phäophytin. Das erstere enthält kein Phytol. das letztere ca. 30%.

Meine Methode der Untersuchung von Pflanzen auf das Vorkommen von amorphem und von kristallisiertem Chlorophyll besteht darin, daß ich durch Behandlung des alkoholischen Blätterauszuges mit Oxalsäure das magnesiumfreie Derivat des Chlorophylls abscheide und dieses nach Umfällen mit Alkohol aus Chloroformlösung der quantitativen Verseifung unterwerfe. Auf diese Weise habe ich in 80 Pflanzen aus 40 Familien Chlorophyll mit einem Phytolgehalt von ungefähr 30% angetroffen.

Das kristallisierte Chlorophyll enthält an Stelle des Phytolrestes ($C_{20}H_{39}$ —) die Methylgruppe. Die Methoxylbestimmung[1]) ergibt, daß in ihm auf 1 Atom Magnesium zwei OCH_3-Gruppen enthalten sind, desgleichen 2 OCH_3 in Phäophorbin, dagegen im Phäophytin eine OCH_3-Gruppe.

Kristallisiertes Chlorophyll	enthält	8·5%	OCH_3
Phäophorbin	„	9·6%	„
Phäophytin (aus Gras)	„	3·5%	„

Das amorphe Chlorophyll ist noch nicht rein dargestellt worden. Die Blätterauszüge enthalten Chlorophyll vermischt mit einem Vielfachen von gelben Verbindungen (Carotin, Xanthophyll) und von farblosen Stoffen (z. B. von Fetten, Wachsen, Zuckern): die Trennung von diesen begleitenden Substanzen ist bis jetzt immer an drei Eigenschaften des amorphen Chlorophylls gescheitert, an seiner Leichtlöslichkeit, Zersetzlichkeit und chemischen Indifferenz. Das Chlorophyll ist weder basisch noch sauer; sobald man es in Verbindungen überführt, hat man nicht mehr Chlorophyll selbst in Händen, sondern ein Produkt der Hydrolyse.[2])

Blattfarbstoff zusammengefaßt hat, enthält das Wort Magnesium noch an keiner Stelle. Vor wenigen Jahren ist es noch strittig gewesen, ob im Chlorophyll Eisen und Phosphor enthalten sind. *H. Molisch* (Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena 1892) hatte es zwar schon wahrscheinlich gemacht, daß Chlorophyll frei von Eisen ist. Dem stand aber die Angabe von *E. Schunck* entgegen, daß die Asche des Phylloxanthins Eisenoxyd als integrierenden Bestandteil enthalte (Contributions to the Chemistry of Chlorophyll. Nr. 4. Roy. Soc. Proc. Vol. **50**. p. 302 [1891]) und das Ergebnis der eingehenden Untersuchungen von *A. Hansen*, daß Chlorophyll Eisen enthalte (cfr. z. B. *A. Hansen*, Die Farbstoffe des Chlorophylls. Darmstadt 1889. S. 58). Die Angabe, Chlorophyll sei eine Phosphorverbindung, ist hauptsächlich von *J. Stoklasa* gemacht worden und wird heute noch von ihm und seinen Schülern leidenschaftlich vertreten (cfr. *J. Stoklasa*, *V. Brdlík* und *J. Just*: Ist der Phosphor an dem Aufbau des Chlorophylls beteiligt? (Ber. d. Deutsch. botan. Gesellsch. Bd. 26. S. 69 [1908]); die Angabe ist aber in meiner zitierten Arbeit widerlegt worden.

[1]) Mitgeteilt aus einer unveröffentlichten Arbeit von *R. Willstätter* und *E. Hug*.

[2]) *A. Hansen* (Die Farbstoffe des Chlorophylls. Darmstadt 1889) hat versucht, Chlorophyll durch die Bildung von Alkalisalzen zu reinigen. *W. N. Hartley* (The Spectra of blue and yellow chlorophyll, with some observations on leaf-green. Journ. Chem. Soc. Vol. 59. p. 106. 1891. — The Spectrum generally attributed to „Chlorophyll“ and its relation to the spectrum of living green tissues. Journ. Chem. Soc. Vol. 85. p. 1607. 1904) hat Chlorophyll als Baryumverbindung abgeschieden. Bei solcher Behandlung wird der Ester Chlorophyll verseift.

Abscheidung. Amorphes Chlorophyll läßt sich intakt, aber verdünnt durch Beimischungen isolieren durch Fällen der alkoholischen Rohchlorophyllösung mit wenig Wasser, zweckmäßig unter Zusatz einer kleinen Menge Kochsalz oder unter Zufügen von Kieselgur, wodurch das sirupöse Produkt gut filtrierbar gemacht wird. Ich verwende für 1 *l* Perkolat aus 1 *kg* Brennesseln 1400 bis 1600 cm^3 Wasser und 50 cm^3 Kochsalzlösung oder 20 *g* Kieselgur.

Mit dem alkoholisch-wässerigen Filtrat wird wenigstens ein Teil der Verunreinigungen (z. B. die Zucker) beseitigt. Diese Mutterlauge aus 1 *kg* Brennesseln gab beim Verdampfen auf dem Wasserbad ca. 23 *g* Rückstand.

Ein anderer Teil der Beimischungen läßt sich fernhalten, wenn man das Pflanzenmehl mit Petroläther, der fast nichts vom grünen Farbstoff daraus aufnimmt, gründlich perkoliert, ehe man es auf Chlorophyll verarbeitet. Der Waschpetroläther von 1 *kg* Brennesseln liefert bei 100° im Vakuum 13·5 *g* Rückstand.

Zwei Reinigungsmethoden habe ich angewendet, um das amorphe Chlorophyll für manche analytische Zwecke von einem Teil seiner Beimischungen zu befreien, beispielsweise für die Prüfung auf Magnesium, Phosphor und Eisen.

Reinigung durch die kolloidale Lösung.[1])

Chlorophyll ist in Wasser kolloidal löslich, und zwar mit ganz anderen Farberscheinungen, als die Lösungen in organischen Solventien zeigen. Lösungen von Chlorophyll und ähnlich von einigen Chlorophyllderivaten in Alkohol, Holzgeist oder Aceton geben beim Verdünnen mit viel Wasser keine Ausscheidung, sondern mattgrüne, fluoreszierende kolloidale Lösungen. Dieselben geben bei vorsichtigem Ausäthern kein oder fast kein Chlorophyll ab, hingegen nimmt der Äther, indem er sich gelb färbt, einen Teil der Verunreinigungen auf. Ein anderer Teil davon hinterbleibt in der wässerigen Mutterlauge, wenn man durch Aussalzen und Ausäthern das Chlorophyll wieder isoliert.

250 cm^3 Acetonextrakt aus 500 *g* Brennesselblättern wurden mit 800 cm^3 Wasser verdünnt und die entstandene kolloidale Lösung dreimal mit je 1250 cm^3 Äther unter nicht zu kräftigem Schütteln gewaschen.

Reinigung nach dem Prinzip der Entmischungsmethode von *Kraus.*

Der grundlegende Versuch von *G. Kraus*[2]) besteht darin, daß der alkoholische, natürlich wasserhaltige Blätterauszug mit Benzol durchgeschüttelt wird. Die benzolische Schicht färbt sich blaugrün, die weingeistige

---

[1]) *R. Willstätter,* Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Ann. d. Chem. Bd. **350**. S. 48 (1906).

[2]) *G. Kraus,* Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe und ihrer Verwandten. S. 88. Stuttgart 1872.

goldgelb. Eine ähnliche Scheidung erzielt man nach *H. C. Sorby*[1]) mit alkoholischem Extrakt und Schwefelkohlenstoff.

R. Sachsse[2]) ersetzte bei dem *Kraus*schen Versuche das Benzol durch Benzin. *L. Marchlewski* und *C. A. Schunck*[3]) haben die Verfahren von *Kraus* und namentlich von *Sorby* verbessert, um Lösungen von Chlorophyll für die spektroskopische Untersuchung zu reinigen. Ferner hat *N. A. Monteverde*[4]) gründliche Angaben über die Anwendung der *Kraus*schen Methode gemacht. Er erhielt in wechselnder Menge, je nach dem Pflanzenmaterial, zwei grüne Farbstoffe, deren einer von Benzin aufgenommen wird, während der andere in die alkoholische Schicht geht.

Die Entmischung führt zwar leicht zu chlorophyllfreien, also farbreinen Lösungen der gelben Chlorophyllbegleiter, aber es gelingt nicht, auf diese Weise das amorphe Chlorophyll frei von Verunreinigungen zu erhalten. Auch bei oftmaliger Wiederholung des Verfahrens bleibt das Chlorophyll sehr stark vermischt mit Begleitstoffen, die sich in ähnlichem Verhältnis zwischen den angewendeten Lösungsmitteln verteilen.

Eine Verbesserung des Verfahrens von *Kraus* finde ich in der Anwendung von Holzgeist statt des Äthylalkohols.

Im wasserhaltigen Holzgeist löst sich, wie ich mit folgendem Vergleich zeige, viel weniger Petroläther als in Weingeist.

50 cm^3 absoluter Alkohol und andrerseits 50 cm^3 Methylalkohol (käuflich) werden mit 50 cm^3 Petroläther vom Siedepunkt 30—50° vermischt. Auf Zusatz von Wasser wird Petroläther in folgendem Maße abgeschieden:

Wasserzusatz	Petroläther aus der Mischung mit Methylalkohol	Petroläther aus der Mischung mit Äthylalkohol
0·7 cm^3	10 cm^3	0
1 „	20 „	0
3 „	40 „	0
5 „	45 „	22 cm^3
10 „	50 „	43 „

Die methylalkoholische Lösung des Farbstoffs läßt sich infolgedessen leichter und schärfer fraktioniert entmischen als die äthylalkoholische und es ist beim Holzgeist nicht notwendig, so stark mit Wasser zu verdünnen wie bei Äthylalkohol, um einen großen Teil des Chlorophylls in Petroläther zu überführen; daher kann mehr von den Beimischungen mit der methylalkoholischen Schicht abgetrennt werden.

---

[1]) *H. C. Sorby,* On a definite method of qualitative analysis of animal and vegetable colouring-matters by means of the spectrum microscope. Proc. Royal Soc. Vol. **15**. p. 433 (1867). — On comparative vegetable chromatology. Proc. Royal Soc. Vol. **21**. p. 442 (1873).

[2]) *R. Sachsse,* Die Chemie und Physiologie der Farbstoffe, Kohlehydrate und Proteinsubstanzen. S. 23. Leipzig 1877.

[3]) *L. Marchlewski* und *C. A. Schunck,* Zur Kenntnis des Chlorophylls. Journ. f. prakt. Chem. [2.] Bd. **62**. S. 247 (1900).

[4]) *N. A. Monteverde,* Das Absorptionsspektrum des Chlorophylls. Acta horti Petropolitani. Vol. **13**. Nr. 9. p. 154 (1893).

Methylalkoholischer Extrakt (2 *l*) aus einem Kilogramm Blättermehl wird mit dem gleichen Volumen von rektifiziertem, niedrig siedendem Petroläther vermischt und dann mit 400 *cm*³ Wasser versetzt. Die wässerigholzgeistige Schicht scheidet sich stark grüngelb gefärbt aus und wird abgelassen. Dann schüttelt man die Petrolätherschicht mehrmals mit wasserhaltigem Holzgeist durch, z. B. mit 1700 *cm*³ Methylalkohol + 300 *cm*³ Wasser, darauf mit 1000 *cm*³ Methylalkohol + 200 *cm*³ Wasser, schließlich mit 1000 *cm*³ Methylalkohol + 100 *cm*³ Wasser. Die Gasolinlösung befreit man durch vorsichtiges Schütteln mit Wasser von aufgenommenem Alkohol (bei kräftigem Durchschütteln wird ein Teil der gelösten Substanz in grünen Flocken gefällt); nach dem Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat wird sie im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur eingedampft. Der Rückstand von Rohchlorophyll[1]) besitzt wachsartige Konsistenz.

Viel höherprozentig erhält man aber das Rohchlorophyll, wenn man nach dem mehrmaligen Durchwaschen mit Holzgeist das Chlorophyll durch weiteres Ausschütteln der petrolätherischen Lösung mit 90%igem Methylalkohol in diesen überführt und es dann wieder mit Petroläther extrahiert.

Quantitative Angaben über das Entmischungsverfahren.[2])

Über die Verteilung des Chlorophylls und der Begleitstoffe zwischen Holzgeist und Petroläther und über den Prozentgehalt des Rohchlorophylls an Chlorophyll gibt der folgende Versuch Aufschluß.

Ich ging aus von 1·8 *l* methylalkoholischer Rohchlorophyllösung, die quantitativ den Farbstoffgehalt von 1 *kg* Brennesseln besaß. Die Entmischung wurde mit 1 *l* Petroläther und 90 *cm*³ Wasser ausgeführt und die obere Schicht, d. i. die petrolätherische Lösung (800 *cm*³), zur Reinigung mit 800 *cm*³ 90%igem Holzgeist, der zuvor mit Petroläther gesättigt worden, durchgeschüttelt. Dann wurden die vereinigten methylalkoholischen Flüssigkeiten (Mutterlauge und Waschholzgeist) mit Wasser verdünnt und zweimal mit je 1 *l* extrahiert. Die erhaltenen drei Lösungen, nämlich

I. die petrolätherische Lösung von Rohchlorophyll,
II. der ätherische Auszug der Mutterlaugen,
III. die methylalkoholisch-wässerigen Mutterlaugen

sind kolorimetrisch mit der ursprünglichen Lösung verglichen und dann eingedampft worden; zur Wägung wurden die Rückstände bei 100° im Vakuum konstant getrocknet.

Fraktion	Chlorophyllwert in Grammen Brennessel	Gewicht des trockenen Rückstandes in Gramm	Prozentgehalt des Rückstandes an amorphem Chlorophyll
I.	288	5·0	28·6
II.	648	19·6	19·8
III.	114	13·4	5·1

[1]) Über wiederholte Reinigung nach demselben Prinzip siehe *R. Willstätter*, Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Ann. d. Chem. Bd. **350**. S. 68 (1906).

[2]) Aus einer unveröffentlichten Arbeit von *R. Willstätter* und *E. Hug*.

Die gelben Begleiter des Chlorophylls (Carotin und Xanthophyll).

Die gelben Begleiter des Chlorophylls lassen sich in zwei Gruppen einteilen: es sind in Benzin leicht, in Alkohol schwer lösliche, andrerseits in Benzin sehr wenig, in Alkohol leicht lösliche Verbindungen. Von jeder der beiden Gruppen ist ein kristallisierender Repräsentant in reinem Zustand bekannt geworden[1]): nach diesen Vertretern ist es zweckmäßig, die zwei Gruppen der gelben Pigmente als Carotin- und als Xanthophyllgruppe zu bezeichnen. Zur ersteren gehören die benzinlöslichen, zur zweiten die alkohollöslichen gelben Farbstoffe der Blätter.

Bei den Bestrebungen, „Reinchlorophyll" aus den alkoholischen Blätterextrakten durch Abtrennen der gelben Begleiter zu isolieren, haben die Entmischungsmethoden von *Kraus* und von *Sorby* die wichtigste Rolle gespielt.

Nach dem *Kraus*schen Verfahren ist es nun aber, auch wenn die Fraktionierung mit Hilfe von Petroläther und wasserhaltigem Holzgeist mehr als zwanzig Male ausgeführt wurde, nicht gelungen, Chlorophyllösungen frei von Carotin zu erhalten. Daß in der Tat die Abtrennung des Carotins vom Chlorophyll dabei unmöglich ist, läßt sich zeigen, indem man die jetzt rein isolierten Stoffe Carotin und Xanthophyll unter den Versuchsbedingungen von *Kraus* und von *Sorby* prüft.[2]) Man gewinnt dadurch ein sicheres Urteil über die Leistungsfähigkeit der beiden Entmischungsmethoden.

1. Die Lösung von Carotin in Petroläther wird so mit Holzgeist versetzt, daß sich die beiden Lösungsmittel nicht mischen. Carotin bleibt größtenteils im Petroläther, die holzgeistig-petrolätherische Schicht wird wenig angefärbt. Auf Zusatz einer Spur Wasser wird die methylalkoholische Schicht farblos. Wendet man Methylalkohol oder Äthylalkohol an, so daß eine klare Mischung mit der petrolätherischen Lösung von Carotin entsteht, so tritt auf Zusatz von wenig Wasser Entmischung ein: die alkoholische Schicht ist farblos.

Man kann bei diesem Versuche ebensogut von einer alkoholischen Carotinlösung ausgehen; man kann auch Benzol anwenden.

2. Zur alkoholischen Carotinlösung wird Schwefelkohlenstoff gegeben. Auf Zusatz von ganz wenig Wasser trennt sich der Schwefelkohlenstoff ab. Er enthält quantitativ das Carotin.

3. Die alkoholische Lösung des Xanthophylls wird mit Petroläther vermischt und mit wenig Wasser entmischt: der weitaus größte Teil des Xanthophylls befindet sich in der weingeistigen Schicht.

4. Man vermischt die alkoholische Xanthophyllösung mit Schwefelkohlenstoff und trennt die beiden Solventien mit wenig Wasser. Xanthophyll verteilt sich zwischen beiden Schichten.

---

[1]) *R. Willstätter* und *W. Mieg*, Über die gelben Begleiter des Chlorophylls. Ann. d. Chemie. Bd. 355. S. 1 (1907).

[2]) *R. Willstätter* und *W. Mieg*, l. c. S. 8.

Hierdurch wird gezeigt, daß das Verfahren von *Kraus* (richtig ausgearbeitet) der Methode von *Sorby* überlegen ist für die Abtrennung des Xanthophylls vom Chlorophyll. Und insbesondere, daß es unmöglich ist, mit einer von diesen Entmischungsmethoden Carotin zu beseitigen. Es geht nicht in den Alkohol. Die Reindarstellung von Chlorophyll durch derartige Entmischung mit Schwefelkohlenstoff haben neuerdings namentlich *L. Marchlewski* und *C. A. Schunck* [1]) angestrebt. Sie führen Chlorophyll aus einem Blätterextrakt in Schwefelkohlenstoff über und reinigen diese Lösung durch mehrmaliges Ausschütteln mit 82%igem Alkohol. Das Ende der Operation wird spektroskopisch daran erkannt, daß eine alkoholische Ausschüttelung an Schwefelkohlenstoff keine gelben Farbstoffe mehr abgibt und nichts mehr von einem zweiten grünen Farbstoff, den *Marchlewski* und *Schunck* als Allochlorophyll bezeichnen.

Es ist nun erwiesen, daß man auf diese Weise das Carotin beim Chlorophyll läßt; man kann es mit Alkohol ebensowenig aus Schwefelkohlenstoff herausholen als aus Benzol oder Benzin. Noch weit mehr bleibt aber das Chlorophyll bei dieser Reinigung mit farblosen Substanzen verdünnt, und zwar mit einem Vielfachen seines Gewichtes.

Bei dem Arbeiten mit Pflanzenextrakten ist die Kenntnis der Eigenschaften von Carotin und Xanthophyll von großem Nutzen; die wichtigsten Angaben der Arbeit von *Willstätter* und *Mieg* sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

	Carotin	Xanthophyll
Formel	$C_{40}H_{56}$	$C_{40}H_{56}O_2$
Aussehen	kupfrige Blättchen	pleochromatische, dunkelbraunrote Täfelchen
Kristallhabitus bei mikroskopischen Kristallen	beinahe quadratische Form	trapezförmig, mit häufiger Zwillingsbildung
Farbe in der Durchsicht	rot	gelb bis orange
Schmelzpunkt (unter Zersetzung)	167·5—168°	172°
Löslichkeit in niedrigsiedendem Petroläther	beträchtlich löslich	unlöslich
Löslichkeit in Alkohol	kalt fast unlöslich, heiß sehr schwer löslich	kalt ziemlich schwer löslich, heiß ziemlich leicht
Löslichkeit in Aceton	recht schwer löslich	leicht löslich
Löslichkeit in kaltem Schwefelkohlenstoff	spielend löslich	ziemlich schwer löslich

[1]) *L. Marchlewski* und *C. A. Schunck,* Zur Kenntnis des Chlorophylls. Journ. f. prakt. Chemie. [2.] Bd. **62**, S. 247 (1900) und *Roscoe-Schorlemmer-Brühl,* Bd. 8 (1901). Kapitel „Chlorophyll“ von *L. Marchlewski.* S. 857.

Die Isolierung von Carotin aus Blättern beschreiben *A. Arnaud*[1]) sowie *R. Willstätter* und *W. Mieg*[2]), die Isolierung des Xanthophylls *Willstätter* und *Mieg.*[3])

Chromatographische Adsorptionsanalyse des Chlorophylls nach M. Tswett.[4])

Als Prinzip seiner Methode gibt *M. Tswett* an, daß Farbstoffe und farblose Substanzen, die in organischen Flüssigkeiten wie Benzol, Benzin, Schwefelkohlenstoff gelöst sind, sich durch pulverförmige Körper mehr oder weniger vollständig niederschlagen lassen, indem sie an der Oberfläche der letzteren adsorbiert werden. Aus den dabei gebildeten physikalischen Adsorptionsverbindungen kann man die Stoffe mit Hilfe von Alkohol, Aceton, Äther oder Chloroform wieder herausholen.

Man verwendet z. B. eine Lösung von Chlorophyll in Petroläther. Schüttelt man sie mit einem Überschuß von pulverförmigem Calciumkarbonat, so werden nach *Tswett* alle Farbstoffe außer Carotin niedergerissen; es genügt aber, dem Lösungsmittel einige Tropfen Alkohol zuzusetzen, um momentan alle Farbstoffe wieder in Lösung zu bringen.

Läßt man die petrolätherische Lösung durch eine Säule von Calciumkarbonat filtrieren, so werden die Farbstoffe also physikalisch niedergeschlagen. Dabei verdrängen sie sich aber gegenseitig aus ihren Adsorptionsverbindungen, und zwar einer gewissen Reihe, der Adsorptionsreihe, gemäß und sie ordnen sich in so viele verschieden gefärbte Zonen, als Teilfarbstoffe vorhanden sind. Es bleibt nur noch die tingierte Säule (das „Chromatogramm") mit dem Skalpell methodisch zu zerlegen und die verschiedenen Farbstoffe mit passenden Lösungsmitteln zu extrahieren.

Mit Hilfe dieser Adsorptionsmethode hat *Tswett* die Zusammensetzung des Blattpigmentes untersucht, allerdings nur spektralanalytisch. Er fand

---

[1]) *A. Arnaud,* Recherches sur les matières colorantes des feuilles; identité de la matière rouge orangé avec la carotine, $C_{18}H_{24}O$. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. T. **100**. p. 751 (1885). — Recherches sur la composition de la carotine, sa fonction chimique et sa formule. Ebenda. T. **102**. p. 1119 (1886). — Dosage de la carotine contenu dans les feuilles de végétaux. Ebenda. T. **104**. p. 1293 (1887). — Recherches sur la carotine; son rôle physiologique dans la feuille. Ebenda. T. **109**. p. 911 (1889). — Sur la carotine. Bull. Soc. Chim. Paris. Nouv. Série. T. **48**. p. 64 (1887).

[2]) *R. Willstätter* und *W. Mieg,* Über die gelben Begleiter des Chlorophylls. Ann. d. Chemie. Bd. 355. S. 1 (1907).

[3]) Ebenda.

[4]) *M. Tswett,* Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. d. Deutsch. botan. Gesellsch. Bd. **24**. S. 316 (1906). — Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. Ebenda. Bd. **24**. S. 384 (1906). — Spektralanalytische Untersuchungen über die Chlorophylline und deren nächste Säurederivate (Chlorophyllane). Ebenda. Bd. **25**. S. 137 (1907). — Über die Spektrophotometrie der Chlorophylline und die Energetik des Chlorophylls. Ebenda. Bd. **25**. S. 388 (1907). — Zur Chemie des Chlorophylls. Über Phylloxanthin, Phyllocyanin und die Chlorophyllane. Biochem. Zeitschr. Bd. **5**. S. 6 (1907).

darin ein Gemisch von wenigstens sieben Farbstoffen. Fünf waren gelbe Farbstoffe, die zwei übrigen bildeten zusammen die „grüne Komponente". Der eine von diesen (α), und zwar der quantitativ überwiegende, besaß in konzentrierter ätherischer Lösung eine rein indigoblaue Farbe, während der zweite (β) chlorophyllgrüne Färbung aufwies.

Die Absorptionsspektren der beiden grünen Farbstoffe bestehen zwischen den *Fraunhofer*schen Linien B und G aus 6 Bändern.

Absorptionsspektra der Chlorophyllfarbstoffe α und β in Äther nach *Tswett.*

	α		
Konzentration:	X	4 X	16 X
Band I	655—667	648—672	640—685
Band II	—	600—620	595—630
Band III	—	Spuren	560—585
Band IV	—	Spuren	520—538
Band V	—	—	485—500
Band VI	426—438	von 445	von 470 < 456
Endabsorption	von 415		

	β		
Konzentration:	X	4 X	16 X
Band I	Spuren	636—647	630—650
Band II	—	—	610—615
Band III	—	—	585—600
Band IV	—	—	560—570
Band V	—	—	532—550
Band VI	448—462	von 470	von 475
Endabsorption	von 430 <		

Intensitätsskala bei α: VI, I, II, III, IV, V.
„ „ β: VI, I, III, V, II = IV.

Abbauprodukte des Chlorophylls.

Umwandlung durch Alkalien.

Es ist lange bekannt, daß Chlorophyll durch Säuren zersetzt und lange umstritten, ob es auch von Alkalien angegriffen wird. Darüber, wie das Chlorophyll reagiert, über die Art des Angriffes saurer und alkalischer Reagenzien hat bis vor kurzem völliges Dunkel geherrscht.

Der Nachweis des Magnesiumgehaltes von Chlorophyll führt zur Erkenntnis, daß die Abbauprodukte des Chlorophylls sich in zwei Klassen einordnen:

I. Magnesiumhaltige Derivate, das sind die Produkte der Einwirkung von Alkalien.

II. Magnesiumfreie Derivate, das sind die Produkte der Einwirkung von Säuren.

Die Chlorophylle sind Ester. Sie werden von Alkalien in der Kälte unter Abspaltung von Phytol und von Holzgeist verseift zu Alkalisalzen von Verbindungen mit saurem Charakter, sogenannten Chlorophyllinen. Aber schon der Verlauf dieser Reaktion ist sehr kompliziert. Ehe die chlorophyllgrünen Alkalisalze entstehen, beobachteten *Willstätter* und *Pfannenstiel* [1]) beim amorphen, *Willstätter* und *Benz* [2]) beim kristallisierten Chlorophyll eine sehr merkwürdige Zwischenphase: die Farbe schlägt in Braungelb um und geht dann in einigen Minuten wieder in tiefes Grün zurück.

Beim Erhitzen von Chlorophyllin mit konzentriertem methylalkoholischem Kali im geschlossenen Gefäß bleibt bis 240° das Magnesium in seiner komplexen Bindung. Dabei entsteht sukzessive eine Reihe von blauen und roten komplexen Verbindungen, die noch ähnliche Fluoreszenzerscheinungen zeigen wie Chlorophyll selbst. Diese magnesiumhaltigen Verbindungen sollen durch Namen mit der Endung „Phyllin" gekennzeichnet werden. Über eines von diesen Phyllinen, Rhodophyllin, sind bis jetzt genaue Angaben veröffentlicht worden. [3]) Eine noch unveröffentlichte Arbeit von *Willstätter* und *H. Fritzsche* hat die Isolierung und Beschreibung der bei 140—240° entstehenden vier Phylline:

Glaukophyllin, Rhodophyllin, Pyrrophyllin, Phyllophyllin [4])

zum Gegenstand gehabt.

Bei der Einwirkung von Säuren wird aus den Phyllinen das Magnesium abgespalten. Die Reihe der so entstehenden Verbindungen, welche an Hämatoporphyrin erinnern und zu denen auch das von *Hoppe-Seyler* [5]) sowie von *Schunck* und *Marchlewski* [6]) entdeckte Phylloporphyrin gehörte, soll als „Porphyringruppe" bezeichnet werden. Den angeführten Phyllinen entsprechen:

Glaukoporphyrin, Alloporphyrin (besser künftig Rhodoporphyrin zu nennen), Pyrroporphyrin, Phylloporphyrin.

Da für die ganze Klasse der magnesiumhaltigen Abbauprodukte die Chlorophyllinsalze als Ausgangsmaterial sehr wichtig sind, sei ihre Ge-

[1]) *R. Willstätter* und *A. Pfannenstiel,* Über Rhodophyllin. Ann. d. Chem. Bd. 358. S. 217 (1908).

[2]) *R. Willstätter* und *M. Benz,* Über kristallisiertes Chlorophyll. Ann. d. Chem. Bd. 358. S. 282 (1908).

[3]) *R. Willstätter* und *A. Pfannenstiel,* Über Rhodophyllin. Ann. d. Chem. Bd. 358. S. 205 (1908).

[4]) Wie der Name Phyllophyllin sagt, ist in diesem Phyllin die Magnesiumverbindung aufgefunden worden, die zu dem bekannten Phylloporphyrin gehört und dasselbe durch Eliminierung des Magnesiums bildet.

[5]) *F. Hoppe-Seyler,* Über das Chlorophyll der Pflanzen. II. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4. S. 193 (1880).

[6]) *E. Schunck* und *L. Marchlewski,* Zur Chemie des Chlorophylls. Zweite Abhandlung. Ann. d. Chem. Bd. 284. S. 81 (1894). — Contribution to the chemistry of Chlorophyll. Nr. 6. Roy. Soc. Proc. Vol. 57. p. 314 (1895).

winnung genau beschrieben. Von den Phyllinen soll das Rhodophyllin als Beispiel für die Methode der Gewinnung und Untersuchung dienen.

Chlorophyllinsalze.

Chlorophyllinkalium.

a) Aus ätherischen Extrakten.[1]) Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Rhodophyllin (und für die Porphyrine) ist es zweckmäßig, das Kaliumsalz aus ätherischen Blätterauszügen zu fällen. Wenn man das so gewonnene Salz nicht reinigt, etwa durch Anrühren mit Alkohol, dann ist es allerdings viel mehr durch Beimischungen verdünnt als bei der Abscheidung aus alkoholischer Lösung. Aber man hat den großen Vorteil, in einer Operation den gesamten Chlorophyllgehalt der Extrakte in einer Form abzuscheiden, die sich für die weitere Bearbeitung mit Alkalien eignet. Die Extraktion des Chlorophylls mit Äther in der Kälte erfolgt übrigens schwieriger[2]) als mit Alkohol; wenn man nicht mit dem Perkolator arbeitet, empfiehlt es sich, das Brennesselmehl mehrere Tage lang unter häufigem Durchschütteln der Flaschen mit Äther zu bearbeiten und nur einfache Extrakte herzustellen.

Die Brennesseln wurden in Portionen von 4 *kg* mit Äther extrahiert und die Chlorophyllösungen mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Beim Schütteln der ätherischen Lösung mit der zur Verseifung erforderlichen Menge konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge (28—30 *cm*³ 28⁰/₀iger Lauge) schlägt die Farbe zuerst in Gelbbraun um und geht dann in einigen Minuten wieder in tiefes Grün zurück. Das Produkt der Verseifung bleibt im Äther gelöst. Durch vermehrten Zusatz der Lauge wird es in flockiger Form abgeschieden, es ist äußerst hygroskopisch und schwierig zu filtrieren. Deshalb stelle ich nach Beendigung der Verseifung durch Zusatz von 80 *cm*³ der Lauge in einem Gusse und unter kräftigem Schütteln eine Ausscheidung her, die sirupös ist und an der Glaswand festhaftet. Wenn hin und wieder unter diesen Bedingungen das Salz dennoch eine feinflockige Suspension bleibt, so bedarf es noch eines weiteren Zusatzes von 10—20, selten von 40 *cm*³ Kalilauge. Die ätherische Mutterlauge behält fast rein gelbe Farbe; sie wird dekantiert.

Das dickflüssige Kaliumsalz wird mit der zur Erhitzung im Autoklaven nötigen Menge methylalkoholischer Kalilauge (ca. 150—180 *cm*³) aus der Flasche herausgelöst und durch Einblasen von Luft unter Erwärmen auf dem Wasserbad von anhaftendem Äther befreit.

---

[1]) *R. Willstätter* und *A. Pfannenstiel*, loc. cit. S. 215.

[2]) Sie ist weniger vollständig wie die folgenden Versuche zeigen: 1. Aus 4 *kg* Brennesselpulver, die schon mit 5 *l* Äther 24 Stunden extrahiert waren, wurde noch ein Auszug mit Alkohol gewonnen und auf Phäophytin verarbeitet. Nach der Reinigung durch Fällen aus Chloroformlösung mit Alkohol betrug die Ausbeute 4·0 *g* Phäophytin. 2. 4 *kg* Brennesseln wurden nach 96stündigem Ausziehen mit Äther noch weiter auf Phäophytin verarbeitet. Ausbeute nach der Umfällung 1·7 *g*.

b) Aus alkoholischen Extrakten.[1] Bei der Verseifung von alkoholischen Rohchlorophyllösungen fällt nur ein Teil des Chlorophyllinkaliums aus; wie in dem Kapitel „Quantitative Chlorophyllbestimmung" gezeigt worden ist, betrug der ausgeschiedene Anteil fast 40% vom Chlorophyllgehalt des Extraktes.

Für die Ausbeute an Kaliumsalz ist es wichtig, daß die Extrakte nicht sehr feucht sind; andrerseits dürfen sie auch nicht absolut wasserfrei sein.

Beim Verarbeiten von nur wenigen Kilogrammen Blätter habe ich erhalten:

Pro 1 *kg* Brennesseln: 3·75 *g* Chlorophyllinkalium, Farbäquivalent 43·9% kristallisierten Chlorophylls (nach der kolorimetrischen Methode 2 *c*); ein solches Präparat soll kurz als 43·9%iges Kaliumsalz bezeichnet werden.

Bei Perkolaten und Doppelextrakten, die im großen Maßstab gewonnen waren, betrug die Ausbeute an freiwillig ausgeschiedenem Kaliumsalz etwa 3 *g* pro 1 *kg* Pflanzenmehl; diese Ausbeute läßt sich aber erhöhen, indem man mehr Sorgfalt auf den Feuchtigkeitsausschluß bei der Herstellung der Extrakte verwendet.

Perkolat von 100 *kg* Brennesseln lieferte 306 *g* Kaliumsalz, Doppelextrakt von 100 *kg* lieferte 321 *g* Kaliumsalz (meist 42—50%ig).

Die Verseifung wird mit 20 cm^3 konzentrierter (28%iger) methylalkoholischer Kalilauge pro Kilogramm Pflanzenmaterial bewirkt. Man vermischt den Extrakt mit der Lauge unter kräftigem Schütteln. Das Ende der Verseifung wird daran erkannt, daß sich aus einer Probe beim Durchschütteln mit Wasser und Äther eine rein gelb gefärbte Ätherschicht absetzt; die Reaktion, welche bei kleinen Proben mit Überschuß von Alkali fast momentan verläuft, erfordert hier einige Stunden. In dieser Zeit fällt noch gar kein Chlorophyllin aus, aber es bildet sich in großer Menge ein dunkelgefärbter, harziger, von Chlorophyllsubstanz beinahe freier Niederschlag, von dem man die Lösung gut dekantieren kann. Sie bleibt dann zur vollständigen Abscheidung des Chlorophylls gut verschlossen 7—10 Tage lang stehen.

Diese Verseifung der Doppelextrakte oder Perkolate führe ich in großen Steinzeugtöpfen aus mit gut aufgeschliffenen Deckeln. Die innere Wand des Zylinders ist glatt gearbeitet; 10 *cm* über dem Boden besitzt das Gefäß einen Tubus. Man kann nach dem Ablassen der Mutterlauge aus diesen Töpfen das Kaliumsalz mit kräftigen Silberspateln bequem abschaben, während es mühselig ist, das Salz aus Glasflaschen herauszuholen.

Das Chlorophyllinkalium wird mit absolutem Alkohol angerieben und ausgewaschen und im Exsikkator getrocknet. Es bildet dann eine blauschwarze, harte, hygroskopische Masse, unlöslich in absolutem Alkohol, spie-

---

[1]) Die Ausbeuteangaben in diesem Abschnitt stützen sich auf noch unveröffentlichte Versuche von *R. Willstätter* und *M. Utzinger*.

lend löslich in Wasser mit brillanter, tiefgrüner Farbe, und zwar stets ohne Fluoreszenz. Die früheren Autoren beschreiben die Alkachlorophyllsalze als fluoreszierend: aber nur den durch weitergehende Umwandlung beim Erhitzen mit Alkalien gebildeten Produkten ist Fluoreszenz eigen.

Analyse [1]) von Chlorophyllinkalium:

	a) aus Rohchlorophyllösungen (Brennessel)	*b)* aus reinem kristallisiertem Chlorophyll
Proc. K	15·33	12·74
„ Mg	1·28	2·92
„ Ca	0·0068	0

Die alkoholische Mutterlauge der Kaliumverbindung gibt eine weitere Ausscheidung von Chlorophyllinsalz beim Versetzen mit (etwa dem gleichen Volumen) Äther. Eine andere zweckmäßige Ausnützung der Mutterlauge ist die Verarbeitung auf Chlorophyllincalcium.

Ätherlösliche Chlorophyllinsalze (Na-, Ca-, Mg-Salz).

Für die Gewinnung von Chlorophyllin eignen sich auch gewisse ätherlösliche Salze, welche *Willstätter* und *Pfannenstiel* [2]) beobachtet und deren Darstellung sie beschrieben haben.

Das Chlorophyllinnatrium läßt sich mit Kochsalz aussalzen und mit alkoholhaltigem Äther extrahieren; durch Petroläther wird es aus der erhaltenen Lösung gefällt. Noch leichter löslich in Äther und bequemer darzustellen sind Magnesium- und Calciumsalz. Die alkoholische Mutterlauge von Chlorophyllinkalium wurde folgendermaßen auf Kalksalz weiterverarbeitet:

Die Mutterlauge wird in Portionen von 15—20 *l* in Glasballons mit dem anderthalbfachen Volumen Wasser verdünnt und das Calciumsalz durch Zufügen der Lösung von 1 *kg* Chlorcalcium ausgefällt. Dabei schüttelt man recht heftig; die ausgeschiedenen Flocken ballen sich dann meistens vollständig zu einer halbfesten zähen Masse zusammen, die an der Gefäßwand festklebt. Noch leichter wird dies erreicht, indem man beim Verdünnen der Chlorophyllinlösung lauwarmes Wasser anwendet. Nach dem Abhebern der Lauge wird das Calciumsalz mit 2—3 *l* Äther aus dem Ballon herausgelöst; die Ätherlösung wäscht man einige Male mit Wasser und trocknet sie mit Natriumsulfat. Man kann nun das Salz entweder mit Petroläther ausfällen oder nach starkem Einengen der ätherischen Lösung mit Alkohol abscheiden, der dann beim Eindampfen noch eine sehr unreine Mutterlaugenportion liefert.

Die Mutterlauge von (189 *g*) Chlorophyllinkalium aus 66 *kg* Brennesseln gab Chlorophyllincalcium, mit Alkohol aus der ätherischen Lösung

---

[1]) Die Analyse ist von meinem Assistenten Herrn *Fritzsche* ausgeführt; das Präparat war reiner als das von *Willstätter* und *Pfannenstiel* (Ann. d. Chem. Bd. 358. S. 216) analysierte.

[2]) *R. Willstätter* und *A. Pfannenstiel*, Über Rhodophyllin. Ann. d. Chem. Bd. 358. S. 218, 219 (1908).

gefällt. 620 *g*; es war farbäquivalent 97 *g* kristallisiertes Chlorophyll, also durchschnittlich 15·6%ig. Die alkoholische Mutterlauge dieses Salzes gab einen Rückstand, der 28 *g* Chlorophyll äquivalent war.

Rhodophyllin.[1]

Beim Erhitzen von Chlorophyllin mit alkoholischem Kali auf 200° entsteht ein Gemisch von einander nahestehenden, prächtig rot gefärbten und fluoreszierenden Substanzen, welche noch das komplex gebundene Magnesium enthalten. Bei der Isolierung fallen als Nebenprodukte magnesiumfreie Verbindungen ab, sogenannte Porphyrine. Die Trennung der Reaktionsprodukte wird durch die Differenzierung ihrer sauren und basischen Eigenschaften ermöglicht.

Das Hauptprodukt zeichnet sich durch seine günstigen Löslichkeitsverhältnisse und sein Kristallisationsvermögen aus; es ist als Rhodophyllin bezeichnet worden.

Darstellung nach *Willstätter* und *Pfannenstiel.* Beim Erhitzen von Chlorophyllin mit Alkalien ist es ratsam, die Anwendung von Glasgefäßen zu vermeiden. Beim Erhitzen in Jenaer Einschlußröhren mit rotem Faden hat das Zink aus dem Glase das Magnesium aus der Chlorophyllsubstanz verdrängt, es entstanden unter den Bedingungen der Rhodophyllinbildung komplexe Zinkverbindungen, namentlich eine schön kristallisierende Verbindung, welche 7% Asche, bestehend aus reinem Zinkoxyd, enthielt. Kontrollversuche haben ergeben, daß Jenaer Einschlußröhren auch beim Erhitzen auf 200° mit alkoholischem Kali allein viel Zinkoxyd abgeben. Auch bei anderen Reaktionen, z. B. bei der Darstellung von Phylloporphyrin nach den Literaturangaben fand ich es unmöglich, in gläsernen Röhren reine (aschefreie) Substanzen zu gewinnen.

Bei Versuchen in kleinem Maßstab verwende ich einen engen hohen Silbertiegel, der in einem vertikal stehenden Einschlußrohr erhitzt wird; zu präparativen Arbeiten findet ein silberner Becher von 325 *cm*³ Inhalt Verwendung, der in einem *Pfungst*schen Autoklaven erhitzt wird.

Die gewöhnliche Charge für Rhodophyllin bestand in 25 *g* Chlorophyllinkalium oder im Chlorophyllinsalz aus dem Ätherextrakt von 4 *kg* Pflanzenmehl, aufgelöst in 150—180 *cm*³ konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge. Die Füllung reichte bis 5 *cm* unterhalb des Randes. Es gelang aber auch mit der nämlichen Menge Lauge in einer Füllung bis zum doppelten Quantum Chlorophyllinsalz zu verarbeiten.

Der Autoklav wurde in das schon angeheizte Ölbad eingesenkt und 2 Stunden lang auf 140° erhitzt; dann ließ man während 2 Stunden die Temperatur allmählich auf 190° ansteigen und hielt schließlich noch 3½ Stunden das Ölbad zwischen 190° und 200°; das Manometer zeigte ungefähr

[1] Nach *R. Willstätter* und *A. Pfannenstiel*, Über Rhodophyllin. Ann. d. Chem. Bd. **358**. S. 205 (1908).

20 Atmosphären an. Abweichungen von dieser ausprobierten Art des Erhitzens waren unvorteilhaft.

Das Rhodophyllin ist säureempfindlich. Sucht man es durch Neutralisation der ganzen Alkalimenge und Ausäthern zu isolieren, so sind die Ausbeuten schlecht. Das Verfahren der Isolierung zielt daher hin auf die Abtrennung des Rhodophyllinkaliums von der Hauptmenge des Ätzkalis. Zugleich erreicht man die Scheidung des Rhodophyllins von zwei anderen roten Magnesiumverbindungen, Phyllophyllin und Pyrrophyllin.

Der Inhalt des Silbertiegels wird mit dem doppelten Volumen Wasser in einen Scheidetrichter gespült. Die Kaliumsalze der Magnesiumverbindungen werden durch das Ätzkali ausgesalzen. Wenn man die Flüssigkeit nun mit $^1/_2$ *l* Äther durchschüttelt, so sammeln sich in etwa $^1/_2$ Stunde die Salze als Schicht von Flocken zwischen dem Äther und der nur schwach rotgefärbten wässerig-alkalischen Mutterlauge an. Mitunter ist es erforderlich, durch Zusatz von Kochsalzlösung die wässerige Schicht zu klären. Diese wird abgelassen, dann läßt man die Kaliumsalze, die mit etwas Wasser und Äther emulsioniert sind, in einen Kolben abfließen und sammelt noch im Scheidetrichter mit ein wenig Wasser den letzten Anteil der Salze, um ihn zur Hauptmenge zu fügen. Das Volumen der Salzemulsion beträgt ungefähr $^1/_4$ *l*. Man vermischt sie mit $^1/_4$ *l* Alkohol und verjagt den Äther auf dem Wasserbade. Dabei scheidet sich das Kaliumsalz des Rhodophyllins als bräunlichrotes Pulver verunreinigt mit farblosen Substanzen ab, während die Salze der daneben gebildeten Magnesiumverbindungen mit dunkelroter Farbe vollständig in Lösung gehen. Das unlösliche Salz wird auf der Nutsche abgesaugt und mit Alkohol nachgewaschen. Das Filtrat enthält nur dann Rhodophyllin, wenn beim Sammeln der Kaliumsalze zuviel Wasser angewandt worden ist.

Um das Rhodophyllin frei zu machen, wird das Salz in feine Verteilung gebracht, indem man es mit Wasser in der Reibschale zu einem gleichmäßigen Brei verrührt, wobei schon viel mit gelbstichig roter Farbe in Lösung geht. Der feine Brei wird mit Wasser in den Scheidetrichter gespült und mit $^1/_4$ *l* Alkohol verdünnt, nicht um die Lösung zu vervollständigen, sondern zu dem Zweck, die Ausscheidung des Rhodophyllins in Flocken zu verhüten und seine Auflösung in Äther zu erleichtern. Man säuert bei Gegenwart von 3 *l* Äther unter Schütteln mit einigen Kubikzentimetern konzentrierter Lösung von Mononatriumphosphat an: die ätherische Lösung wird mit Wasser gewaschen und dabei von den darin suspendierten wenig gefärbten Flocken befreit. Die phosphorsaure Mutterlauge lohnt die Verarbeitung auf Porphyrine.

Zur Reinigung wird das Rhodophyllin durch Ausschütteln mit sehr verdünntem, nämlich mit ca. 0·03%igem Ammoniak dem Äther entzogen und dann abermals in ätherische Lösung übergeführt durch erneutes Ansäuern mit Phosphat bei Gegenwart von etwas Alkohol und viel Äther. Aus der Ätherlösung wäscht man den Alkohol gründlich heraus: nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird sie im Wasserbade auf etwa 100 cm^3

bis höchstens 50 cm^3 eingeengt. Schon während des Abdampfens scheidet sich der größte Teil des Rhodophyllins aus in schönen, glitzernden Kristallen von blauer Oberflächenfarbe. Die Kristallisation vervollständigt sich bei kurzem Stehen. Die Substanz wird auf dem Filter mit Äther nachgewaschen. Die Mutterlauge liefert bei starkem Konzentrieren nur noch eine kleine Menge brauchbarer Kristallisation.

Nach diesem Verfahren habe ich Rhodophyllin aus Grünalgen, Laubmoos, Farnkraut, Schachtelhalm, Gras und mehreren Dicotyledonen dargestellt, hauptsächlich (und zwar über 200 *g*) aus Brennesseln.

Die Mengen der neben Rhodophyllin entstehenden roten Magnesiumverbindungen sind sehr beträchtlich: bei den Brennesseln machte Rhodophyllin etwa $^1/_3$, bei Gras $^1/_4$, bei Farnkraut $^1/_6$ der ganzen Ausbeute an roten Chlorophyllderivaten aus.

48 *kg* Brennesseln (1907) gaben in 12 Chargen 17·05 *g* reines Rhodophyllin.

Bei einer unveröffentlichten Versuchsreihe, ausgeführt gemeinsam mit Herrn *M. Utzinger*, wurde die Mutterlauge des Rhodophyllins, wie oben erwähnt, auf Porphyrine verarbeitet, dabei lieferten:

		Rhodophyllin		Phylloporphyrin		Alloporphyrin und Glaukoporphyrin
33 *kg* Brennesseln	100 *g* Chlorophyllinkalium (43·8%) →	6·0 *g*	+	3·6 *g*	+	2·0 *g*
	plus					
	250 *g* Chlorophyllincalcium (18·2%) → (und eine Mutterlaugenportion)	3·1 *g*	+	4·5 *g*	+	2·3 *g*
→		9·1 *g*	+	8·1 *g*	+	4·3 *g*

Diese Ausbeuten sind oft erheblich übertroffen worden: Die besten Ausbeuten betrugen 3·1 *g* Rhodophyllin aus 25 *g* (40 bis 45%) Chlorophyllinkalium und bei Verarbeitung von ätherischem Blätterextrakt 0·46 *g* bis 0·50 *g* Rhodophyllin aus 1 *kg* Blätter.

Eigenschaften. Rhodophyllin kristallisiert in Prismen von gipsähnlichem Habitus, wahrscheinlich monoklin, oft bildet es spindelähnliche Formen. Die Kristalle zeigen in der Aufsicht tiefstahlblaue bis rötlichblaue Farbe, in der Durchsicht je nach ihrer Dicke olivgrüne bis rötlichbraune und rubinrote Farbe. Die Lösungen sind blaustichig rot, kirschsaftähnlich gefärbt und besitzen intensive blutrote Fluoreszenz.

Rhodophyllin ist leicht löslich in absolutem Alkohol (1 *g* heiß in 250 cm^3), schwerer in Äther (1 *g* erfordert zum Auflösen $1^1/_2$ *l* feuchten Äther). Es besitzt sauren Charakter; 0·01%ige Natronlauge und auch sehr verdünntes Ammoniak entziehen die Substanz auf einmal vollständig ihrer alkalischen Lösung.

Charakteristisch ist das Verhalten von Rhodophyllin gegen Eisessig. Darin lösen sich die Kristalle zunächst mit schön dunkelroter Farbe auf.

Nach einigen Augenblicken, bei größter Verdünnung nach ein paar Minuten, trübt sich die Flüssigkeit unter quantitativer Abscheidung des magnesiumfreien Alloporphyrins in Form eines prächtig flimmernden, kristallisierten Niederschlages von rötlichvioletter bis grauvioletter Farbe.

Das Absorptionsspektrum des Phyllins erinnert sehr an Hämin, es besteht aus zwei scharf begrenzten starken Bändern im Orange bis Gelb und im Grün, denen noch ein sehr viel schwächeres Band im Grün folgt (Fig. 52). Der Hauptunterschied vom Hämin besteht darin, daß das Band

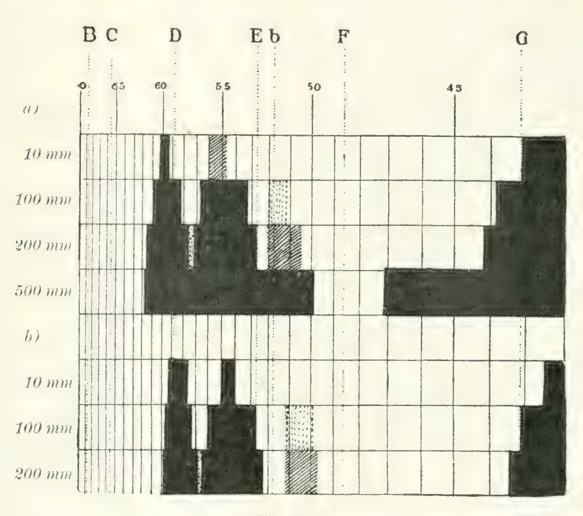


Fig. 52.

des Hämins im Orange nach rechts gerückt ist und fast das ganze Gelb umfaßt.

Die Lösung von 0·1 *g* Rhodophyllin in 5 *l* Alkohol zeigt in 100 *mm* Schicht Band I bei λ 610—581, Band II 568—532, Band III 520.512, Endabsorption von 438 an.

Die Figur zeigt in *a)* das Spektrum dieser alkoholischen Lösung, in *b)* das Spektrum auf Zusatz von Ätzkali.

Zusammensetzung. Die Analyse umkristallisierter Präparate ergab die Mittelwerte: C 68·64
H 6·02
N 10·18
Mg 4·28, welche ungefähr der Formel $C_{33}H_{34}O_4N_4Mg$ entsprechen.

Umwandlung durch Säuren.

Die Einwirkung von Säuren auf Chlorophyll und auf die Phylline besteht darin, daß das komplex gebundene Magnesium quantitativ abgespalten wird; es wird dabei einfach durch Wasserstoff ersetzt. Die entstehenden Produkte sind frei von Mineralbestandteilen.

Wird die Reaktion mit Säure vorsichtig ausgeführt, so bleiben die Estergruppen im Chlorophyll intakt, was z. B. aus der Methoxylzahl des Phäophorbins hervorgeht.

Als Ausgangsmaterial für viele magnesiumfreie Derivate des Chlorophylls eignet sich am besten das Spaltungsprodukt, das ich durch Einwirkung von Oxalsäure auf Rohchlorophyllösungen erhalten habe. Da es in Alkohol sehr schwer löslich ist, gelingt es, in dieser Form fast den gesamten Chlorophyllgehalt des Extraktes in reiner Form abzuscheiden.

Die Zersetzlichkeit des Chlorophylls durch Säure ist seit vielen Jahrzehnten bekannt. Aber es war bis in die jüngste Zeit nicht gelungen, ein reines Spaltungsprodukt bei der Einwirkung von Säure zu isolieren und dadurch zu dem in der Natur so außerordentlich verbreiteten Chlorophyllalkohol zu gelangen, der etwa 30% des amorphen Chlorophylls ausmacht. Die Einwirkung von Säure auf die Blätterextrakte ist zumeist so gehandhabt worden, daß die Chlorophyllsubstanz dabei verdorben wurde, z. B. bei der Darstellung von Phylloxanthin mit gasförmigem Chlorwasserstoff.

Die von verschiedenen Autoren durch saure Hydrolyse erhaltenen Spaltungsprodukte des Chlorophylls müssen, da ihre Eigenschaften und ihre Zusammensetzung wesentlich differieren, mit verschiedenen Namen gekennzeichnet werden. Das aus amorphem Chlorophyll bei vorsichtiger Behandlung mit Oxalsäure in der Kälte gebildete Spaltungsprodukt habe ich Phäophytin, das in der Zusammensetzung wesentlich davon abweichende Derivat des kristallisierten Chlorophylls Phaeophorbin genannt.

Die folgende Tabelle dient für den Vergleich des Phäophytins mit dem Phylloxanthin *E. Schuncks*[1]) und mit dem Chlorophyllan von *Hoppe-Seyler*[2]), welches durch freiwillige Zersetzung des Chlorophylls in Grasdekokten erhalten worden ist.

	Phäophytin	Phylloxanthin	Chlorophyllan
Darstellung	Einwirkung von wenig Oxalsäure in der Kälte auf den kalt hergestellten alkoholischen Blätterextrakt	Einleiten von Chlorwasserstoff in den heiß gewonnenen weingeistigen Blätterextrakt	Eindunsten eines bei Siedehitze dargestellten alkoholischen Extraktes von Gras

[1]) *E. Schunck*, Contributions to the chemistry of Chlorophyll. Nr. IV. Roy. Soc. Proc. Vol. **50**. p. 302 (1891). — *E. Schunck* und *L. Marchlewski*, Zur Chemie des Chlorophylls. Ann. d. Chem. Bd. **278**. S. 329 (1894).

[2]) *F. Hoppe-Seyler*, Über das Chlorophyll der Pflanzen. I. Abh. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **3**. S. 339 (1879).

	Phäophytin	Phylloxanthin	Chlorophyllan
Reinigung	Lösen in Chloroform, Abfiltrieren der mineralischen Beimischungen, Fällen mit Alkohol	Ausschütteln der ätherischen Lösung mit konzentrierter Salzsäure zur Abtrennung von Phyllocyanin. Dann Fällung mit Alkohol aus Chloroformlösung, wiederholtes Herauskommenlassen aus siedendem Eisessig sowie aus Äther	Umkristallisieren aus Alkohol und Äther
Asche	Gibt keine Asche	Gibt Asche, die stets einen integrierenden Gehalt an Eisen aufweist	Gibt Asche. Sie enthält 1·38% P und 0·34% Mg
Zusammensetzung	Frei von Fett. Analyse der Präparate aus Gras: C 75·6 H 8·4 N 6·4 O 9·6	Fettsubstanz enthaltend. Analysen nicht bekannt. Als isomer angesehen [1]) mit Phyllocyanin, dessen Zusammensetzung nach *Tschirch* [2]) ist: C 69·8—69·9 H 6·5— 6·9 N 7·4— 7·7 O 15·5—16·3	C 73·3 H 9·7 N 5·7
Kristallisierbarkeit	Amorph, manchmal mit Übergängen zu kristallinischer Struktur	Amorph	Gut und vollständig kristallisierend
Löslichkeit in Petroläther	Äußerst schwer löslich	—	leicht löslich
Reaktion in Eisessig mit Zinkacetat	Gibt sehr leicht eine intensiv blaugrüne, stark rot fluoreszierende komplexe Verbindung	Reagiert nicht [3])	—
Reaktion in Eisessig mit Salpetersäure	Tiefblaue Farbe, die über Rotbraun allmählich in Gelbbraun übergeht	Tiefgelbe Färbung	—

[1]) *E. Schunck,* Contributions to the chemistry of Chlorophyll. Nr. IV. Roy. Soc. Proc. Vol. **50**. p. 307 (1891). — The chemistry of Chlorophyll. II. Annals of Botany. Vol. **6**. p. 236 (1892).

[2]) *A. Tschirch,* Über die Phyllocyaninsäure. Verhandl. d. Gesellsch. Deutsch. Naturforscher und Ärzte, Wiener Versammlung 1894. II. S. 380. — Der Quarzspektrograph und einige damit vorgenommene Untersuchungen von Pflanzenfarbstoffen. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. Bd. **14**. S. 87 (1896).

[3]) *E. Schunck,* Contributions to the chemistry of Chlorophyll. Nr. IV. Roy. Soc. Proc. Vol. **50**. p. 310 (1891). — The chemistry of Chlorophyll. II. Annals of Botany. Vol. **6**. p. 237 (1892). *E. Schunck* und *L. Marchlewski,* Zur Chemie des Chlorophylls. Ann. d. Chem. Bd. **278**. S. 335 (1894). Entgegen diesen Angaben publiziert neuerdings

Phäophytin.

Darstellung nach *R. Willstätter* und *F. Hocheder.*[1])

Die Farbe der alkoholischen Chlorophyllösung schlägt bei der Einwirkung von Säuren schnell um in Dunkelbraun und zugleich verschwindet die starke Fluoreszenz. Die Reaktion wird durch Zufügen einer in der Kälte frisch bereiteten konzentrierten Lösung kristallwasserhaltiger Oxalsäure in 96%igem Alkohol bewirkt. In der Regel sind 2·5 bis 5 *g* Oxalsäure für den Liter Doppelextrakt erforderlich. Zunächst versetzt man die Chlorophyllösung auf einmal mit 2·5 *g* Oxalsäure pro Kilogramm Pflanzenmaterial und fügt, wenn daraufhin in einer Viertel- bis halben Stunde kein gänzlicher Wechsel der Farbe eingetreten ist, weiter in kleinen Portionen mit Pausen die noch zur Vervollständigung des Farbenumschlags erforderliche Säuremenge hinzu.

Schon während des Zufügens der Oxalsäure beginnt das Ausfallen eines flockigen Niederschlages, der hauptsächlich aus Phäophytin und oxalsauren Salzen, namentlich von Magnesium und Calcium, ferner von Kalium und Aluminium besteht. Bei eintägigem Stehen wurde die Abscheidung vollständig und der Niederschlag setzte sich so dicht zu Boden, daß sich die Hauptmenge der Flüssigkeit dekantieren ließ. Die Mutterlauge enthielt nur noch wenig von schwer löslichem Phäophytin, aber doch keine ganz geringe Menge von Chlorophyllderivaten. Eine Isolierung der letzteren in reinem Zustand ist noch nicht erreicht worden. Im übrigen enthält die Phäophytinlauge sehr viel von den gelben Begleitern des Chlorophylls; aber man bekommt sie daraus nicht in kristallisiertem Zustand.

Das ausgeschiedene Gemisch von Phäophytin und Oxalaten wird an der Nutsche abgesaugt, mit Alkohol mehrmals nachgewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Zur Beseitigung der Salze und ersten Reinigung diente immer eine Umfällung aus Chloroformlösung durch Alkohol: die Metallverbindungen hinterblieben beim Auflösen und die Mutterlauge hielt organische Verunreinigungen zurück. Nur bei Gewinnung von Phäophytin in sehr großem Maßstab war es lohnend, noch eine Laugenportion aus der Chloroform-Alkoholmischung zu isolieren.

Die Filtration der Chloroformlösung ist schwierig und erfordert ziemlich große Verdünnung; zunächst wurde mit großen Nutschen an der Pumpe gearbeitet, danach war, da etwas von dem feinen Niederschlag mitgerissen worden, noch drei- bis viermaliges Filtrieren durch glatte Filter

---

L. Marchlewski (*L. Hildt, L. Marchlewski* und *J. Robel,* Über die Umwandlung des Chlorophylls unter dem Einflusse von Säuren. Extrait du Bulletin de l'Acad. des Sciences de Cracovie. p. 295. April 1908), daß auch Phylloxanthin mit Zinkacetat eine komplexe Verbindung gebe. Aber die angeführte alte Angabe hat *E. Schunck* so nachdrücklich zu wiederholten Malen als Merkmal des Phylloxanthins bezeichnet, daß man eben ein Präparat, das mit Zinkacetat reagiert, nicht als Phylloxanthin ansehen darf.

[1]) *R. Willstätter* und *F. Hocheder,* Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. Ann. d. Chem. Bd. **354**. S. 205 (1907).

notwendig, um das Phäophytin aschefrei zu erhalten. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bei gewöhnlicher Temperatur stark eingeengt und die dicke, fast schwarze Lösung mit dem fünf- bis zehnfachen Volumen Alkohol (von 96%) gefällt.

Phäophytin ist nicht in deutlich kristallisierter Form erhalten worden. Für die präparativen Zwecke ist das Rohprodukt genügend rein: zum Nachweis seiner Homogenität kann man es durch Auflösen in siedendem Alkohol, Filtrieren und Herauskommenlassen nach Art des Umkristallisierens, durch sogenanntes „Umscheiden“ [1]), weiter reinigen oder fraktionieren.

Die Ausbeute an Phäophytin betrug bei Verarbeitung vieler verschiedener Pflanzen gewöhnlich ca. 3 *g* aus 1 *kg* des trockenen Krautes.

100 *kg* Brennesseln lieferten 424 *g* Phäophytin (ohne Verwendung der Mutterlaugen). Da 1 *kg* käufliche getrocknete Brennesseln ca. 6 *g* amorphes Chlorophyll enthalten, entsprach diese Ausbeute 72·5% der Theorie.

Eigenschaften: Phäophytin ist ein Wachs, zäh, schwierig zu pulvern. Es ist blauschwarz gefärbt, in Lösungen olivbraun und bei großer Schichtdicke in der Durchsicht rot. Es ist in heißem Alkohol ziemlich schwer, in kaltem sehr schwer löslich, in Äther träge, aber beträchtlich, in Eisessig ziemlich leicht, in Chloroform spielend, in Benzol sehr leicht löslich, in Petroläther fast unlöslich.

Phäophytin besitzt weder basische noch saure Eigenschaften. Es verbindet sich leicht mit Metallsalzen zu intensiv gefärbten, sehr beständigen Komplexverbindungen. Mit Ferrisalz entsteht sofort in der Kälte eine schön grünstichig blaue Lösung, die sehr schwach fluoresziert. Zinkacetat gibt eine schön blaugrüne, in der Durchsicht rote Flüssigkeit, die sich durch starke Fluoreszenz auszeichnet. Kupferacetat verwandelt das Braun des Phäophytins auch in großer Verdünnung in intensives Grün: die Lösung fluoresziert nicht.

Konzentrierte Salpetersäure zerstört Phäophytin beim Kochen, auf der hellen Flüssigkeit schwimmt dann als farblose Ölschicht ein stickstoffhaltiges Derivat des Phytols.

Charakteristisch ist auch die Reaktion der ätherischen Phäophytinlösung mit konzentrierter Salpetersäure: beim Schütteln färbt sich der Äther blau, während die Säure nichts Gefärbtes aufnimmt: beim Waschen mit Wasser nimmt die ätherische Lösung wieder die ursprüngliche Olivfarbe an.

Absorptionsspektrum in ätherischer Lösung (0·1 *g* in 5 *l*): in mittlerer Schicht treten in der sichtbaren Region fünf breite Streifen auf. Reihenfolge der Intensität: I, IV, II, V, III.

I λ 688—640, II 622—597, III 569—556 (mit Schatten bis 551), IV 542—525, V 515—488, Endabsorption von 479 an.

Zusammensetzung. Phäophytin aus Gras, durch Umscheiden gereinigt, enthielt 75·1% C, 8·4 H, 6·7 N.

---

[1]) *R. Willstätter* und *F. Hocheder*, Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. Ann. d. Chemie. Bd. **354**. S. 221 (1907).

Phäophorbin.

Das magnesiumfreie Derivat des kristallisierten Chlorophylls wird (nach *R. Willstätter* und *M. Benz* [1]) ähnlich wie Phäophytin gewonnen. Wenn man 5%ige wässerige Oxalsäure zur Lösung des Chlorophylls in 96%igem Alkohol zufügt, so ist die für den Magnesiumgehalt des Chlorophylls berechnete Menge der Säure ausreichend, während die Reaktion bei Ausschluß von Wasser einen beträchtlichen Überschuß an Säure erfordert.

Beim Versetzen von 8 *g* Chlorophyll in 800 cm^3 Sprit mit 28·75 cm^3 der Oxalsäurelösung erfolgt sofort die Abscheidung der Hauptmenge in dunkelbraunen Flocken. Diese sind aber nicht etwa fertiges Phäophorbin, sondern ein eigentümliches Zwischenprodukt, das noch mit grüner Farbe in Alkohol löslich ist. In einigen Stunden verwandelt es sich in Phäophorbin, das sich in Alkohol wenig löst und dessen Lösungen olivbraun gefärbt sind.

Beim Aufnehmen mit Chloroform hinterbleibt reines Oxalat ($MgC_2O_4 . 2H_2O$); durch Alkohol wird Phäophorbin gefällt.

Zum Unterschied vom Phäophytin ist Phäophorbin gut kristallisierbar. Während das erstere neben Phytol nur ein Molekül Methylalkohol enthält, spaltet Phäophorbin bei der Hydrolyse zwei Moleküle Holzgeist ab.

Phytol. [2]

Nach *R. Willstätter* und *F. Hocheder* wird Phäophytin wie irgend ein anderes Wachs von alkoholischen Alkalien leicht verseift. Während die Zusammensetzung des sauren Komplexes, nämlich der empfindlichen stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte, ungemein abhängig ist von den Bedingungen der Verseifung, beeinflussen diese gar nicht die Zusammensetzung des abgespaltenen Alkohols und nur wenig die Ausbeute an demselben.

Da in der Kälte leicht Klümpchen von Phäophytin unangegriffen bleiben, ist es vorzuziehen, die Verseifung in der Wärme auszuführen und das Phäophytin dafür so fein wie möglich zu pulvern, was allerdings bei der zähen Beschaffenheit des Materials Geduld erfordert.

200 *g* Phäophytin werden mit 1·5 *l* methylalkoholischer Kalilauge (200 *g* im Liter enthaltend) im Wasserbad zwei Stunden lang gekocht. Nach dem Erkalten fügt man zu der dunkelgrünen Lauge, die eine starke Ausscheidung von rotbraunem Kalisalz enthält, mehr als das gleiche Volumen Äther hinzu und soviel Wasser, daß sich gerade die ätherische Schicht klar abtrennt. Sie wird abgehoben und die Lauge noch mehrmals mit viel Äther ausgeschüttelt; man vereinigt die Ätherextrakte. Dieselben sind braun gefärbt durch eine Beimischung von stickstoffhaltigen Substanzen, die sich am besten durch aufeinanderfolgende Bearbeitung mit Alkali, Salzsäure

[1]) *R. Willstätter* und *M. Benz*, Über kristallisiertes Chlorophyll. Ann. d. Chemie. Bd. **358**. S. 267 (1908).

[2]) *R. Willstätter* und *F. Hocheder*, Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. Ann. d. Chemie. Bd. **354**. S. 240 (1907).

und Tierkohle beseitigen lassen. Zunächst schüttelt man die ätherische Lösung mit sehr verdünnter Lauge durch und eine Reihe von Malen anhaltend mit wenig konzentrierter Salzsäure, die sich blaugrün anfärbt. Dann wird der Äther oft mit viel Wasser gewaschen und auf etwa 1·5 *l* eingeengt. Schließlich werden die letzten färbenden Verunreinigungen durch stundenlanges Schütteln mit guter, reiner Tierkohle an der Maschine entfernt. Die ätherische Lösung trocknet man mit Natriumsulfat, dann wird sie konzentriert und im Vakuum ganz eingedampft. Um die letzten Spuren vom Lösungsmittel zu verjagen, erwärmt man den Eindampfrückstand mit eingetauchter Kapillare ³/₄ Stunden lang im Vakuum auf 90°.

Die Tierkohle hält etwas Phytol zurück; bei den größeren Versuchen und bei genauen Ausbeutebestimmungen[1]) ist sie besonders mit Äther zu extrahieren, sie gibt aber nur einen Teil des absorbierten Phytols (nämlich 0·1—0·5°/₀ vom Phäophytin) wieder ab.

Die Isolierung des Phytols ist beinahe quantitativ; die Ausbeute beträgt ungefähr 30°/₀ vom Phäophytin.

Eigenschaften. Phytol ist ein aliphatischer, ungesättigter, primärer Alkohol von der Formel $C_{20}H_{40}O$. Seine Kohlenstoffkette enthält Verzweigungen; nach einer Untersuchung von *R. Willstätter* und *E. W. Mayer*[2]) liegt die Doppelbindung sehr wahrscheinlich zwischen dem fünften und sechsten Kohlenstoffatom (vom hydroxyltragenden an gerechnet).

Phytol ist ein farbloses, ziemlich dickes Öl, das sich mit allen üblichen organischen Solventien mischt. Es siedet nur in hohem Vakuum unzersetzt, Siedepunkt unter 0·03—0·04 *mm* Druck 145°. $D\frac{0}{4} = 0{\cdot}864$.

Das Natriumsalz des Phytols ist leicht löslich in Äther. Die Phtalestersäure[3]) bildet ein sehr charakteristisches Silbersalz: Prismen vom Schmelzpunkt 119°, die sich in Äther und Benzol leicht lösen.

Das Phenylurethan schmilzt bei 26—28·8°. Phytol addiert ein Molekül Brom. Es ist autoxydierbar.

Quantitative Phytolbestimmung.

Vom kristallisierten Chlorophyll unterscheidet sich das amorphe durch seinen Gehalt an Phytol. Meine Methode der Untersuchung von Pflanzen auf ihren Gehalt an kristallisiertem und an amorphem Chlorophyll besteht in der

[1]) Um bei den quantitativen Phytolbestimmungen die Verluste an Phytol bei der Reinigung durch Tierkohle möglichst gleichmäßig zu machen, werden immer gleiche Mengen von Tierkohle und gleiche Konzentration der Phytollösungen angewendet. Für die Absorption des Phytols durch Tierkohle ist folgender Versuch von Interesse: 5·7 *g* Phytol wurden in 0·5 *l* Äther mit 11 *g* getrockneter Tierkohle 5 Stunden geschüttelt; die Tierkohle hatte 1·38 *g* Phytol aufgenommen. Bei sechsstündigem Kochen mit 0·5 *l* Äther gab sie nur 0·54 *g* Phytol wieder ab.

[2]) Unveröffentlicht.

[3]) In der ersten Arbeit über Phytol war die Isolierung der Phtalestersäure an den irreführenden Löslichkeitsverhältnissen ihrer Salze gescheitert; in der Untersuchung mit Herrn *E. Mayer* ist die Darstellung der Verbindung gelungen.

Abscheidung des Phäophytins aus der Rohchlorophyllösung und quantitativen Verseifung desselben (Bestimmung der „Phytolzahl").

Diejenigen Pflanzen, welche das amorphe Chlorophyll enthalten, liefern ungefähr 30% (28—33%) des Phäophytins an Phytol; diejenigen Pflanzen, welche überwiegend das kristallisierte Chlorophyll enthalten, liefern wenig oder fast kein Phytol.

Eine Probe von Galeopsis tetrahit ergab die Phytolzahl: 1·8.

Wenn die Phytolzahl normal gefunden wird (ca. 30), so ist das ausschließliche Vorkommen von amorphem Chlorophyll (Phytolesterchlorophyll) in der untersuchten Pflanze unzweifelhaft.

Anders wenn die Phytolzahl zu niedrig gefunden wird, z. B. zwischen 15 und 25%. Dann ist das Resultat stets unsicher. In solchen Fällen ist es angezeigt, die Prüfung der betreffenden Pflanze mit verschiedenen Ernten und namentlich mit ungetrocknetem oder mit sorgfältigst getrocknetem Material zu wiederholen, um festzustellen, ob wirklich die niedrige Zahl eine Konstante für die untersuchte Pflanze ist.

Eine Probe von Tussilago Farfara gab Phäophytin mit nur 17·1% Phytol, ich wiederholte mit einer anderen Ernte die Untersuchung und fand 27·7% Phytol. Solche Beobachtungen beweisen, daß mitunter beim Aufbewahren und Trocknen der grünen Blätter Veränderungen im Chlorophyll eintreten, bei welchen Phytol abgespalten oder oxydiert wird. Wahrscheinlich ist der Phytolverlust eine Folge von Enzymwirkungen oder auch von Gärungs- und Fäulnisprozessen in den Blättern.

Um die Verbreitung der verschiedenen Chlorophylle kennen zu lernen, habe ich eine Untersuchung gemeinsam mit den Herren *F. Hocheder* und *E. Hug* begonnen.[1]) Bei dem Vergleich der Phäophytine aus Ernten verschiedener Jahre und Jahreszeiten traten bei Gras, Brennesseln, Platane keine erheblichen Unterschiede auf. Auch Kulturbedingungen und Standort waren ohne Einfluß.

Platane	Zürich	August 1906	Phytolzahl	30·2
„	„	Juni 1907	„	30·6
„	„	Oktober 1907	„	31·2
„	Halle a. S.	Sommer 1907	„	30·6
„	Zürich	September 1908	„	31·0
Gras	„	Anfang Juni 1908	„	31·6
„	„	Ende September 1908	„	31·3

Nach dieser Methode der Phytolbestimmung wurde das kristallisierende Chlorophyll bis jetzt nur bei einigen Tubifloren nachgewiesen, im übrigen

[1]) Unveröffentlicht.

aber bei Pflanzen aus den verschiedensten Klassen und Ordnungen derselbe Alkohol Phytol in meistens derselben Menge angetroffen, so zum Beispiel in:

Ulva lactuca (Chlorophyceae)	29·6% vom Phäophytin
Hyloconium (Musci)	29·4 ,, ,, ,,
Adiantum capillus Veneris (Filicales) .	30·6 ,, ,, ,,
Equisetum arvense (Equisetales) . . .	30·2 ,, ,, ,,
Lycopodium clavatum (Lycopodiales) .	33·6 ,, ,, ,,
Taxus baccata (Coniferae)	30·5 ,, ,, ,,
Quercus (Fagaceae)	30·5 ,, ,, ,,
Corylus avellana (Betulaceae)	30·5 ,, ,, ,,
Nasturtium officinale (Cruciferae) . .	30·2 ,, ,, ,,
Rubus idaeus (Rosaceae)	32·0 ,, ,, ,,
Cassia angustifolia (Leguminosae) . .	28·8 ,, ,, ,,
Althaea officinalis (Malvaceae) . . .	29·4 ,, ,, ,,
Viola odorata (Violaceae)	30·2 ,, ,, ,,
Apium graveolens (Umbelliferae). . .	29·0 ,, ,, ,,
Mentha piperita (Labiatae).	30·8 ,, ,, ,,
Pulmonaria officinalis (Borraginaceae) .	31·6 ,, ,, ,,
Digitalis purpurea (Scrophulariaceae) .	28·3 ,, ,, ,,
Tanacetum vulgare (Compositae). . .	30·1 ,, ,, ,,

Für die quantitative Verseifung des Phäophytins diente im wesentlichen dasselbe Verfahren wie bei der Phytolgewinnung, und zwar in zwei Ausführungsweisen:

a) für die Verseifung von kleinen Mengen (0·3 bis ca. 1 *g*) Phäophytin zur ungefähren Ermittlung des Phytolgehaltes (Fehler: Phytolverlust von 0·2—1% vom Phäophytin je nach der Sorgfalt bei der Ausführung) und

b) Verseifung von 2—5 *g* Phäophytin zur genauen Bestimmung der Phytolzahl und z. B. zum Vergleich verschiedener Ernten der nämlichen Pflanze (Fehler: Phytolverlust von 0·2—0·5% des Phäophytins).

a) Das feingepulverte Phäophytin wird mit 24%iger methylalkoholischer Kalilauge (5—6 cm^3 für 1 *g*) in einem reagensglasähnlichen Gefäß (30 bis 40 cm^3 Inhalt) mit etwas verjüngtem Hals und aufgeschliffenem Kühlrohr zwei Stunden lang im Wasserbad gekocht. Darauf wird im nämlichen Gefäß ohne Zusatz von Wasser fünf bis sechsmal ausgeäthert. Dabei ist die Masse, welche zäh wird, jedesmal mit dem Äther gut zu verrühren und anzuschütteln; der Äther wird einfach dekantiert. Die vereinigten ätherischen Lösungen werden nur mit Wasser mehrmals gewaschen und mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Dann werden sie mit reiner, aber nicht besonders getrockneter Tierkohle 15 Minuten geschüttelt, und zwar bei einer Konzentration von 200 cm^3 für 1 *g* angewandtes Phäophytin mit 0·1 *g* Tierkohle. Die abermals filtrierte Lösung wird eingedampft; endlich spült man den

Rückstand mit wenig Äther quantitativ in ein tariertes leichtes 15 *cm*³-Kölbchen mit langem Halse (um Verspritzen auszuschließen) und aufgeschliffenem Helm (siehe die Fig. 53). Der Äther wird durch $^3/_4$ Stunden langes Erwärmen im Vakuum auf 90° mit eingetauchter Kapillare verjagt und das Phytol auf der analytischen Wage gewogen.

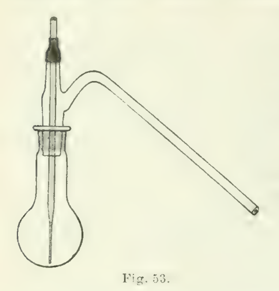


Fig. 53.

b) Die Verseifung wird in einem Rundkölbchen mit aufgeschliffenem Kühlrohr ausgeführt; dann wird das Phytol im Tropftrichter unter Zusatz von Wasser vier- bis fünfmal mit Äther extrahiert. Diese Art des Ausätherns ist weniger bequem und zeitraubender, weil oft Emulsionen auftreten; aber man vermeidet die Möglichkeit, daß die Masse Spuren von Phytol zurückhält. Die Isolierung erfolgt wie bei *a)*.

Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten.

Beim Abbau des Chlorophylls entstehen im allgemeinen Gemische von Spaltungsprodukten, für deren Trennung und Reinigung bis vor kurzem keine Methoden existiert haben und deren Erkennung sehr unsicher gewesen ist. Diese hochmolekularen Substanzen besitzen oft gleiche, oft sehr ähnliche Zusammensetzung und zeigen in ihren Reaktionen, ihren Farberscheinungen, sowie im Verhalten gegen Lösungsmittel große Übereinstimmung. Solange solche Reaktionsprodukte gemischt vorliegen, ist ihre Kristallisation erschwert. Die übliche Untersuchungsweise derartiger Chlorophyllderivate, in den Händen vieler Forscher sogar die einzige Methode, war die Spektralanalyse, und zwar nicht die viel zu schwierige vollständige Beobachtung der Absorption, sondern nur die Feststellung der Maxima. Die Methode hat auf diesem Gebiete nicht vor den schwersten Irrtümern geschützt. Sie gibt, so lange die Konstanten der reinen Stoffe nicht bekannt sind, wenig Aufschluß darüber, ob die Verbindungen einheitlich und rein sind oder ob sie in Gemischen vorliegen. Während die spektralanalytische Methode für manche Veränderungen und Zersetzungen reiner Substanzen einen übertriebenen Ausdruck gibt, ist sie gänzlich unanwendbar für kompliziertere Mischungen von Verbindungen, deren Reinisolierung in Angriff genommen werden soll.

Sehr viele Abbauprodukte des Chlorophylls ändern beim Abdampfen der ätherischen Lösungen oder beim Umkristallisieren oder beim Trocknen im Exsikkator ihre Farbe, also ihr Absorptionsspektrum wesentlich, und zwar oft nur infolge von sehr geringfügigen Änderungen in ihrem Molekül, wie z. B. durch Abspaltung von Wasser. So werden die Lösungen von Glaukophyllin, welche frisch wunderschön blau sind, beim Eindampfen und

Wiederaufnehmen mit Äther mehr und mehr rhodophyllinähnlich, also rot. Spektroskopisch ist dieser Effekt viel größer als etwa der einer Verunreinigung durch Rhodophyllin. Bei der Charakterisierung der Chlorophyllderivate durch ihre Absorptionsspektren ist daher der Zustand der Präparate viel sorgfälliger zu berücksichtigen, als dies nach den Literaturangaben geschehen ist.

In einer gemeinsam mit Herrn *W. Mieg*[1]) ausgeführten Untersuchung bin ich zu einer von der Spektralanalyse unabhängigen Trennungs- und Untersuchungsmethode gelangt, die sich auf die eigentümliche basische Natur vieler Chlorophyllderivate gründet. Sie ist anwendbar für die Phytochlorine, Phytorhodine und für die Porphyrine.

Chlorophyll selbst ist allerdings weder Base noch Säure. Die mit Alkalien entstehenden Abbauprodukte, die Phylline, haben nur sauren Charakter; so lange das Molekül komplex gebundenes Magnesium enthält, kann man es nicht mit sauren Agentien berühren, ohne Zersetzung zu bewirken.

Phäophytin und Phäophorbin enthalten keine saure Gruppe und sind auch so schwach basisch, daß sie sich nur in starker Salzsäure, und zwar unter Veränderung lösen.

Beim Verseifen von Phäophytinpräparaten mit alkoholischem Kali treten zwei Reihen von Verbindungen auf, die zugleich schwach sauer und schwach basisch sind: die Phytochlorine, welche in indifferenten Solventien olivgrüne bis grüne, in saurer Lösung blaugrüne bis blaue Farbe zeigen und die Phytorhodine, die in saurer Lösung blau bis grün, in neutraler Lösung prächtig rot gefärbt sind.

Phytochlorine sind auch erhalten worden durch Einwirkung von Alkalien auf chlorophyllanartige Extrakte, Phytorhodine durch Behandlung von Chlorophyllinen mit alkoholischer Chlorwasserstoffsäure. Von der ersten Gruppe habe ich bis jetzt 6 Glieder (Chlorine a—f), von der zweiten 8 Repräsentanten (Rhodine a—h) beschrieben.

Zugleich sauer und basisch sind ferner die Porphyrine, das sind die rot gefärbten Verbindungen, welche aus den Phyllinen durch den Austritt von Magnesium entstehen.

Die Phytochlorine und Phytorhodine sind in Wasser unlöslich, in organischen Solventien mehr oder weniger löslich. Als schwache Säuren lösen sie sich in Alkalien, auch in Ammoniak und Bikarbonat und werden von diesen aus ätherischer Lösung quantitativ aufgenommen. Sie enhalten nur esterifizierbare saure Gruppen, ihre Ester sind nämlich alkaliunlöslich. Alle sind schwache Basen, deren Salze durch Wasser vollständig zerlegt werden.

Dabei sind ihre basischen Eigenschaften ungleich differenzierter als ihre sauren und zeigen Unterschiede und Abstufungen, wie sie bei schwachen organischen Basen noch nicht beobachtet worden sind.

Um aus ätherischer Lösung in Salzsäure, die im Überschusse angewandt wird, überzugehen, erfordern diese Verbindungen Säure von be-

[1]) *R. Willstätter* und *W. Mieg*, Über eine Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten. Ann. d. Chem. Bd. **350**. S. 1 (1906).

stimmter Konzentration. Schwefelsäure und gar Phosphorsäure sind praktisch weniger gut anzuwenden, weil die nötigen Konzentrationen recht hoch sind. Für jede einzelne Substanz sind Grenzen charakteristisch, so zwar, daß Salzsäure bis zu einer gewissen Stärke der ätherischen Lösung nichts oder nur Spuren, eine etwas konzentriertere einen großen Teil, endlich eine noch stärkere so gut wie alles bei einmaligem Durchschütteln entzieht. Die Konzentration der ätherischen Lösung und die Menge der Salzsäure üben selbstverständlich auf das Resultat einen erheblichen Einfluß aus, den man bei der praktischen Anwendung wohl berücksichtigen muß. Natürlich rücken die Grenzzahlen, je stärker die Basen sind, desto enger zusammen, wenn man nicht die relative Konzentration der Chlorwasserstoffsäure, sondern den Prozentgehalt der Salzsäure in Betracht zieht. Über die Grenzen bei den Phytochlorinen orientiert folgende Tabelle:

Phytochlorin	Spuren gehen in Salzsäure von	Geht sehr reichlich in Salzsäure von	Geht fast vollständig in Salzsäure von
a	3·5	6·5	7·5
b	1·5	3·5	5
c	0·5	1·5	2
d	0·15	0·5	1
e	1	2·75	4
f	9	11	12

Den Beobachtungen liegen folgende normale Arbeitsbedingungen zugrunde: 1—2 cm^3 ätherische Lösung, die 0·2—0·3 *g* Substanz in 100 cm^3 enthält, werden mit demselben Volumen Salzsäure einmal durchgeschüttelt. Mit verdünnteren Lösungen wurde für die Phytochlorine a und b die Verteilung zwischen Äther und Salzsäure quantitativ untersucht.

Drei Portionen von je 0·100 *g* wurden in je 100 cm^3 Äther gelöst und mit je 100 cm^3 Salzsäure 5 Minuten lang durchgeschüttelt. Dann trennte man die Schichten und dunstete die mit wenig Wasser gewaschene ätherische Lösung vorsichtig ein; der Rückstand wurde im Vakuum über Schwefelsäure zur Konstanz getrocknet. Die nachstehende Tabelle verzeichnet die von den verschiedenen Salzsäuren aufgenommenen Anteile.

Phytochlorin	Prozentgehalt der Salzsäure	Aufgenommene Substanz in Prozenten
a	8	84·1
a	7	73·8
a	6	60·7
b	5·5	74·4
b	4	54·7
b	2·5	26·4

Auf der verschiedenen Basizität beruht die Möglichkeit der Trennung. Das Beispiel der Phytochlorine a und b diene wiederum zur Beschreibung. Man erhält sie gemengt mit schwächer basischen Substanzen. Schüttelt man die ätherische Lösung[1]) wiederholt mit 4%iger und 7%iger Salzsäure durch und wäscht man die beiden sauren Lösungen gründlich mit Äther, um die in jedem Fall mit aufgenommenen schwächeren Basen wieder herauszuholen, so gelingt es, einen ansehnlichen Teil von a und b in ziemlich reinem Zustande zu isolieren.

Viel besser ist eine zweite Ausführungsweise der Fraktionierung. Ihr Prinzip besteht darin, die Verbindungen in der Reihenfolge ihrer Basizität mit so schwachen Säuren zu extrahieren, daß von den nächst schwächeren Basen nur minimale Spuren gelöst werden können. Natürlich muß man die stärksten Säuren anwenden, die dieser Bedingung noch genügen. So isoliert man im gegebenen Falle Phytochlorin b mittelst 3%iger Salzsäure. Da diese aber b nicht quantitativ aus dem Äther herausholt, ist es notwendig, danach durch wiederholtes Ausschütteln mit 4·5%iger Säure eine Mittelfraktion abzutrennen, ehe man an die Extraktion von a geht. Hierfür dient nunmehr 6%ige Säure. Auch diesmal sind die (3- bzw. 6%igen) salzsauren Lösungen der Phytochlorine mit Äther zu waschen. Dann erhält man schon bei der einmaligen Fraktionierung die Substanzen in reinem Zustande.

Etwas abgeändert wird das Verfahren, um die Chlorophyllderivate vollkommen zu reinigen, wenn sie schon in ziemlich reinem Zustande vorliegen, beispielsweise so, wie sie bei der ersten, hinsichtlich der Ausbeute vorteilhafteren Art des Trennungsverfahrens erhalten wurden. So löst man Phytochlorin a in Äther auf, wäscht die Lösung wiederholt mit 4·5%iger Salzsäure durch und extrahiert dann die Base mit 6·5%iger Säure.

Auf dieselbe Weise werden auch die schon gereinigten Substanzen wieder in Fraktionen zerlegt und deren Identität bewiesen.

Anwendbar ist die Methode gerade bei diesen gefärbten Stoffen. Es ist nur hier ein Leichtes, für jeden Fall die zur Isolierung geeigneten Säuren auszuprobieren und nach der Farbintensität der Auszüge den extrahierten Anteil zu schätzen. Dabei ist es wichtig, verschiedene Auszüge einer Substanz hinsichtlich der Farbnuance zu vergleichen, um zu beurteilen, ob sie einheitlich ist.

Eine ähnliche Trennung der Chlorophyllderivate mit Alkalien ist nicht möglich, da ihre Alkalisalze im allgemeinen weit weniger hydrolytisch gespalten werden, aber man kann, allerdings viel weniger gut, mit Hilfe von Alkalien nach den gemeinhin üblichen Methoden fraktionieren. So wurde z. B. bei der Reinigung von Phytorhodin f, dem nach einer rohen Fraktionierung mit Salzsäure noch recht ähnlich basische Verbindungen beigemengt waren, derart verfahren, daß man den zur Neutralisation erforderlichen Betrag von Alkali sehr verdünnte, in eine Reihe von Portionen teilte

[1]) Es ist natürlich nicht notwendig, mit der Lösung des Gemisches zu arbeiten, aber die Anwendung in gepulverter Form führt schwerer zum Ziele.

und mit diesen sukzessive die ätherische Lösung ausschüttelte. Dann wurden die wieder in Äther gebrachten Fraktionen nach ihrer Farbe beurteilt.

Eine solche Ergänzung der in saurer Lösung ausgeführten Fraktionierung ist nur ausnahmsweise nötig gewesen. Fast stets erhielt ich dabei die Verbindungen in einheitlichem Zustande, so daß sie ohne weitere Reinigung aus ätherischer Lösung gut kristallisierten. Die farblosen Verunreinigungen der Chlorophyllderivate, wie Fette, Wachse, die sich durch bloßes Umkristallisieren schwer abtrennen lassen, sind durch das Aufnehmen mit verdünnter Säure beseitigt.

Nicht weniger wertvoll als für die Trennung ist die Fraktionierungsmethode für die qualitative Analyse, nämlich die Bestimmung der Abkömmlinge des Chlorophylls. Bei allen möglichen Reaktionen, die zu einigermaßen basischen Stoffen führen, kann man die Reaktionsprodukte schon im Reagenzglas [1]) untersuchen, indem man die ätherischen Lösungen mit Salzsäuren von abgestufter Konzentration durchschüttelt. Man beobachtet, ob die Produkte Gemische oder einheitlich sind und vermag sie nach ihrer Basizität einzuordnen. Die geringsten Veränderungen der beschriebenen Chlorophyllderivate beim Trocknen in der Wärme oder beim Aufbewahren wurden dadurch auffällig.

Um die beschriebene Methode zur Untersuchung des Rhodophyllins und anderer Phylline anzuwenden, zersetzt man dieselben mit Säuren und prüft die entstehenden Porphyrine: aus der Basizität eines Porphyrins und aus seiner Einheitlichkeit kann man auf das zugrunde liegende Phyllin zurückschließen.

Basizität der Porphyrine [2]):

Glaukoporphyrin	geht	sehr	reichlich	in	$3\frac{1}{2}\%$iger	Salzsäure
Rhodoporphyrin [3])	„	„	„	„	3% „	„
Pyrroporphyrin	„	„	„	„	$1\frac{1}{2}\%$ „	„
Phylloporphyrin	„	„	„	„	$\frac{3}{4}\%$ „	„

Phytochlorin e und Phytorhodin g aus Gras.

Als Beispiel für die Anwendung der Trennungsmethode von *Willstätter* und *Mieg* mögen Phytochlorin e und Phytorhodin g dienen, die von den vielen Verbindungen der beiden Gruppen die wichtigsten sind. Sie sind von *Willstätter* und *Hocheder* [4]) als Hauptprodukte der Spaltung von Phäophytin aus Gras durch Alkalien erhalten worden. In einer noch unveröffentlichten Fortsetzung der Arbeit hat es sich gezeigt, daß die Phäo-

---

[1]) Ich verwende Tropftrichter in Reagenzglasform.

[2]) Die Tabelle ist einer unveröffentlichten Arbeit von *R. Willstätter* und *H. Fritzsche* entnommen.

[3]) Die Angabe von *Willstätter* und *Pfannenstiel* über die Basizitätszahl des Alloporphyrins wird hierdurch berichtigt.

[4]) *R. Willstätter* und *F. Hocheder*, Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. Ann. d. Chem. Bd. **354**. S. 232 (1907).

phytine aus den meisten untersuchten Pflanzen gerade diese beiden Abbauprodukte liefern. Phäophytin aus Brennesseln macht dabei eine Ausnahme. Aber aus mehr als 50 verschiedenen Pflanzen wurden allerdings in schwankenden Mengenverhältnissen immer wieder und wieder das Phytochlorin e und Phytorhodin g bei der aufeinander folgenden Einwirkung von Säure und von Alkali erhalten.

Phäophytin aus Gras (33·7 *g*) wurde mit Hilfe von Seesand und Äther in feine Verteilung gebracht, da es sehr schwer pulverisierbar war, und mit der dreifachen Gewichtsmenge konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge nur $^1/_2$ Stunde lang gekocht. Nach dem Aufnehmen mit Wasser und Extrahieren des Phytols wurde die alkalische Flüssigkeit sehr schwach angesäuert und mit viel Äther (26 *l*) ausgeschüttelt. Außer ätherunlöslichen schwächer basischen Produkten waren hauptsächlich zwei schöne Verbindungen entstanden: ein Chlorin, welches von 3%iger Salzsäure sehr reichlich, von 2%iger schon beträchtlich aus Äther extrahiert wird und ein Phytorhodin, das aus der ätherischen Lösung reichlich von 9%iger Salzsäure aufgenommen wird; von 6%iger Salzsäure wird es spurenweise, von 11%iger fast vollständig extrahiert.

Die ätherische Lösung wird ohne Rücksicht auf die reichliche Menge von Flocken, die darin suspendiert ist, mit 6%iger Salzsäure wiederholt ausgezogen, dann wird sie auf das Phytorhodin weiter verarbeitet.

Um das von der Salzsäure aufgenommene Phytochlorin zunächst von schwächeren Basen zu reinigen, verdünnt man die Lösung auf einen Gehalt von 4% Salzsäure und schüttelt sie 2mal mit Äther aus. Was in den Äther geht, kann man verwerfen. Dann wird die salzsaure Lösung neutralisiert und gründlich ausgeäthert: das Phytochlorin geht nur schwierig aus schwach salzsaurer Lösung heraus.

Die letzte Reinigung des Phytochlorins erfolgte so, daß die Substanz nochmals aus der Ätherlösung, die gegen 14 *l* betrug, in 3%ige Salzsäure gebracht wurde. Die salzsaure Lösung wurde diesmal, um stärker basische Beimischungen zu beseitigen, nur annähernd, nämlich auf einen Chlorwasserstoffgehalt von 0·5%, neutralisiert und wieder mit Äther extrahiert. Die Lösung, nach dem Waschen und Filtrieren im Vakuum eingeengt, schied vier Fünftel des Phytochlorins (3·8 *g*) kristallisiert ab; die ätherische Mutterlauge hinterließ beim Abdampfen im Vakuum noch 1 *g* etwas weniger reiner Substanz.

Nach dem Extrahieren des Phytochlorins mit Hilfe von 6%iger Salzsäure wäscht man die rote Ätherlösung, die das Phytorhodin enthält, noch einige Male mit 6%iger Salzsäure und schüttelt sie dann mit 9%iger Salzsäure wiederholt aus. Aus dieser Säure entfernt man durch Waschen mit Äther schwächer basische Verunreinigungen. Dann wird die Lösung mit Wasser auf das Doppelte verdünnt und das Phytorhodin mit Äther extrahiert; diese Isolierung bezweckt zugleich eine Reinigung nach der Seite der stärkeren Basen, die von 4·5%iger Salzsäure zurückgehalten werden.

Die ätherische Lösung wird mit Wasser gewaschen. Man darf sie nicht mit Natriumsulfat trocknen. Die Substanz zeigt die Eigentümlichkeit, sehr schnell vom Natriumsulfat aufgenommen zu werden; man kann sie dann nur durch Schütteln mit verdünnter Säure und Äther wieder herausholen. Die verdünnte Ätherlösung scheidet schon beim Stehen schön kristallisiertes, reines Phytorhodin g aus und gibt nach dem Einengen im Vakuum noch eine zweite Kristallisation. Zur Ausbeute an reiner Substanz (1·2 *g*) kam noch eine weniger reine Mutterlaugenportion (0·9 *g*) aus der mit 9%iger Salzsäure nur unvollständig verwerteten ursprünglichen Ätherlösung.

Die wesentlichen Merkmale der beiden Spaltungsprodukte — die Farbeigenschaften sind für die Klassen der Phytochlorine und Phytorhodine typisch — sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

	Phytochlorin e	Phytorhodin g
Ungefähre empirische Formel	$C_{30}H_{32}O_4N_4$	$C_{30}H_{32}O_6N_4$
Prozentgehalt der Salzsäure, die aus Äther sehr reichlich extrahiert	2·75	9
Kristallisation aus Äther	metallisch glänzende, rechtwinklige Täfelchen	dunkelrote, derbe, schief endigende Prismen
Farbe in Äther	olivstichig grün, dunkelrot fluoreszierend	dunkelweinrot, dunkelrot fluoreszierend
Farbe in Salzsäure	blau, wenig grünstichig	smaragdgrün
Farbe in Eisessig	tiefblau	blaustichig tiefrot
Löslichkeit in Alkohol	heiß leicht, kalt schwer	ziemlich leicht

Phylloporphyrin.

F. Hoppe-Seyler[1]) hat bei hohem Erhitzen von Chlorophyllan mit Ätzkali ein Abbauprodukt erhalten, das dem Hämatoporphyrin optisch sehr ähnlich war: er bezeichnete es als Phylloporphyrin. *E. Schunck* und *L. Marchlewski*[2]) haben diese Verbindung eingehender untersucht. Die folgende neue

[1]) *F. Hoppe-Seyler,* Über das Chlorophyll der Pflanzen. II. Zeitschr. physiol. Chem. Bd. **4**. S. 193 (1880). — Siehe auch *A. Tschirch,* Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1884. S. 84.

[2]) *E. Schunck* und *L. Marchlewski,* Zur Chemie des Chlorophylls. II. Abhandlung. Ann. d. Chem. Bd. **284**. S. 81 (1894). — Contributions to the Chemistry of Chlorophyll. Nr. 6. Roy. Soc. Proc. Vol. **57**. p. 314 (1895).

Methode zur Darstellung des Phylloporphyrins ist vor kurzem von *L. Marchlewski*[1]) angegeben worden: die wesentlichen Verbesserungen bestehen in der Verarbeitung der beschriebenen Doppelextrakte aus getrockneten Blättern, in der Anwendung des Autoklaven[2]) an Stelle der gläsernen Röhren und hauptsächlich in der Fraktionierung des entstehenden Gemisches nach der Methode von *Willstätter* und *Mieg*.

Marchlewski beschreibt die Gewinnung des Phylloporphyrins folgendermaßen: Ein Doppelextrakt aus getrockneten Blättern wird mit einem geringen Überschuß von gesättigter Baryumhydroxydlösung versetzt. Der gebildete Baryumlack wird abfiltriert, in Alkohol von 96% suspendiert und vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure tropfenweise versetzt. Das gebildete Baryumsulfat reißt einen Teil des Farbstoffes zu Boden, der Hauptteil bleibt jedoch in Lösung. Die alkoholische Lösung wie auch der Niederschlag können weiter getrennt verarbeitet werden, und zwar wird die alkoholische Lösung bei ganz schwach saurer Reaktion stark konzentriert, mit 10%iger alkoholischer Kaliumhydroxydlösung versetzt und sodann im Autoklaven auf 200° während 4 Stunden erhitzt. Der Niederschlag wird in 10%iger alkoholischer Kalilauge suspendiert und ebenfalls unter Druck auf 200° erwärmt. Die weitere Verarbeitung ist in beiden Fällen gleich. Die im Autoklaven verbleibende Masse wird mit Essigsäure neutralisiert, mit Alkohol verdünnt und auf dem Wasserbade erwärmt. Das gebildete Phylloporphyrin geht in Lösung, während ein Gemisch von braunen Körpern ungelöst zurückbleibt. Die alkoholische Lösung wird sodann auf dem Wasserbad stark konzentriert, mit Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Das Phylloporphyrin und gewisse Chlorophyllderivate gehen in Lösung. Die ätherische Lösung wird sodann mit einer 5%igen Salzsäure durchgeschüttelt. Das Phylloporphyrin geht in die Säure über, begleitet von einem kleinen Teil der Verunreinigungen. Die 5%ige salzsaure Lösung wird nun mit Natriumacetat versetzt, wodurch das Phylloporphyrin in Form eines rotbraunen Schlammes abgeschieden wird. Die erhaltene Suspension wird von neuem mit Äther extrahiert und die ätherische Lösung des Phylloporphyrins wiederum mit Salzsäure, aber diesmal nur einer 1%igen, durchgeschüttelt. Jetzt geht das Phylloporphyrin, nicht mehr von Beimengungen begleitet, in die Säure über. Die saure Lösung wird mit einer kleinen Menge Äther durchgeschüttelt, wobei etwas Porphyrin wieder entzogen wird, der Hauptteil bleibt aber in der Säure gelöst. Die saure Lösung wird nun mit Natriumacetat versetzt und das abgeschiedene Porphyrin in Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wird verdampft und der Rückstand 2mal aus Alkohol umkristallisiert, wobei prächtig schimmernde Plättchen erhalten werden.

---

[1]) *L. Marchlewski*, Über eine einfache Methode zur Darstellung des Phylloporphyrins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 847 (1908).

[2]) Nach *R. Willstätter* und *A. Pfannenstiel*, Über Rhodophyllin. Ann. d. Chem. Bd. 358. S. 208 (1908).

Hinsichtlich der verarbeiteten Mengen und der Ausbeuten fehlt es an Angaben.

Ich bediene mich für die Gewinnung der Porphyrine eines einfacheren Verfahrens, das sich eng an die Methode zur Gewinnung des Rhodophyllins anlehnt.

Chlorophyll oder Chlorophyllinsalz wird mit konzentriertem methylalkoholischem Kali im Silbertiegel mittelst des *Pfungst*-Autoklaven erhitzt. Anstatt das Reaktionsprodukt nach vorsichtigem Ansäuern auf Rhodophyllin zu verarbeiten, wird die beim Ansäuern erhaltene Fällung in Salzsäure aufgelöst. So entstehen aus den Phyllinen die Porphyrine; das Gemisch derselben wird nach der Methode von *Willstätter* und *Mieg* fraktioniert. Die Zusammensetzung des Gemisches ist von der Dauer und Höhe des Erhitzens abhängig; beim Erhitzen wie zur Darstellung von Rhodophyllin besteht das Gemisch nach Abspaltung des Magnesiums überwiegend aus Rhodo- und Phylloporphyrin, die sich leicht mit der Salzsäuremethode trennen lassen.

Eigenschaften. Phylloporphyrin kristallisiert nach *E. Schunck* und *L. Marchlewski* [1]) in dunkelviolett gefärbten Prismen, die sich ziemlich schwer in Alkohol und Äther mit karmoisinroter Farbe und mit roter Fluoreszenz lösen. Es besitzt basische und saure Eigenschaften.

Das Spektrum des Phylloporphyrins in Äther besteht nach *Schunck* und *Marchlewski* aus 7 Bändern: I λ 630 bis λ 622, II 615 bis 612, III 600 bis 595, IV 576 bis 566, V 563 bis 558, VI 537 bis 512, VII 505 bis 473. Dieses Absorptionsspektrum stimmt mit dem des Hämatoporphyrins gänzlich überein, nur sind bei dem letzteren alle Bänder ein wenig nach Rot hin verschoben.

Zusammensetzung. *Schunck* und *Marchlewski* finden C 75·98, H 7·10, N 11·02% und stellen die Formel $C_{32}H_{34}O_2N_4$ auf, die *Marchlewski* durch den Ausdruck $(C_{16}H_{18}ON_2)_x$ ersetzt.

---

[1]) Loc. cit. und *E. Schunck* und *L. Marchlewski*, Contributions to the Chemistry of Chlorophyll. Nr. 7. Roy. Soc. Proc. Vol. **59**. p. 233 (1896). — Zur Chemie des Chlorophylls. IV. Abhandlung. Ann. d. Chem. Bd. **290**. S. 306 (1896). — Ferner *L. Marchlewski*, in *Roscoe-Schorlemmer-Brühl*. Bd. 8. S. 884 (1901).

Tierische Pigmente und Farbstoffe.

Von **Franz Samuely**, Freiburg i. B.

Allgemeiner Teil.

Das Kapitel der „tierischen Farbstoffe“ ist ein Kapitel der Entsagung chemischer Analyse und biochemischer Forschung.

Das heute vorliegende Material über tierische Farbstoffe, über ihre Verbreitung im Tierreich und über ihre physiologischen Beziehungen ist ein umfangreiches. Gegenüber der Fülle dieser Beobachtungen ist unser Wissen über die chemische Natur der meisten Farbstoffe und Pigmente ein bedauerlich geringes. Die Armut unserer Kenntnisse erklärt sich gewiß zum größten Teil durch die Schwierigkeit, ausreichendes und reines Material darzustellen. Die in den Geweben vorhandenen Farbbestandteile genügen oft nur, um ihre Existenz und einige ihrer Eigenschaften in geeigneten Lösungsmitteln nachzuweisen. Aber auch in Fällen größerer Materialvorräte hat bis jetzt entweder die Labilität der Substanzen oder die außergewöhnliche Resistenz derselben gegen chemische Agentien jede ersprießliche chemische Bearbeitung unmöglich gemacht. Es wird daher alles das, was wir über die Methoden der Isolierung und Analyse tierischer Farbstoffe, besonders von den vielartigen Farbstoffen in der niederen Tierwelt berichten können, nur geringen Raum ausfüllen. Aber selbst da, wo es sich um die Bearbeitung von Pigmenten und Farbstoffen aus Sekreten und Gewebsflüssigkeiten von Vertebraten handelt (Galle, Harn, Blut), steht bis heute nur das Methodische im Vordergrund. Die Konstitutionsaufklärung auch dieser Körper bewegt sich zum Teil noch in den ersten Anfängen.

Wir müssen es uns an dieser Stelle versagen, die qualitativen Eigenschaften der Farbstoffe wiederzugeben. In diesem Punkt muß auf die Handbücher und Lehrbücher verwiesen werden. Für die Farbstoffe der niederen Tiere ist vor allem die Monographie von *v. Fürth* [1]) maßgebend, in welcher der Chemiker auch die Fundorte der Tierspezies erschöpfend beschrieben findet.

---

[1]) *O. v. Fürth,* Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. Fischer, 1903. (Ausführliche Literatur vgl. besonders Kap. IX. S. 491 ff.)

Zur Methodik der Farbstoffisolierung seien einige Bemerkungen vorausgeschickt: Liegen die Farbstoffe in Lösungen vor, d. h. in Sekreten oder Exkreten, so besteht die Aufgabe der Darstellung in einer Fällung derselben in unlöslicher Form oder in einer Extraktion durch geeignete indifferente Lösungsmittel. Farbstoffe aber, die sich in Geweben amorph vorfinden, werden den feinzerteilten, eventuell vorher bei niederer Temperatur getrockneten und gepulverten Organteilen durch geeignete Lösungsmittel entzogen. Man versuche in allen Fällen zuerst Wasser und dann organische indifferente Solventien, und vermeide nach Möglichkeit Alkalien oder Säuren, da diese leicht sekundäre Veränderungen hervorrufen. Doch sind auch Farbstoffe bekannt, die ohne Änderung ihrer Eigenschaften in Säuren oder Alkalien primär löslich sind. Andere hingegen, und dies gilt vor allem von den dunkelschwarz gefärbten Pigmenten in der Tierreihe, sind nur durch eine Veränderung ihrer primitiven chemischen Natur in Alkalien löslich.

Die Wahl des geeigneten Extraktionsmittels entscheidet bisweilen die Möglichkeit einer Reindarstellung und einer Kristallisation des tierischen Farbstoffes, da diese letztere nur bei Abwesenheit von kristallisationshemmenden Körpern (Eiweiß, Fette, Lipoide) gelingt.

Gehen gleichzeitig mehrere Farbstoffe in einem Extraktionsmittel in Lösung, so kann man durch Extraktion bei alkalischer oder saurer Lösung eine Trennung versuchen.

Jedenfalls versuche man zur ursprünglichen Extraktion möglichst viele Solventien, allein oder in gegenseitiger Kombination.

Gewinnt man reine Lösungen, deren Rückstand nicht kristallisationsfähig ist oder quantitativ nur spärlich ausfällt, so ist man auf die Feststellung qualitativer Reaktionen angewiesen. Spezialreaktionen bestimmter chemischer Farbstoffgruppen sind bis jetzt kaum bekannt. Nur für ganz wenige Substanzen, wie die Lipochrome, oder die Uranidine sind einige Klassenmerkmale vorhanden, die mehr oder weniger willkürlich eine Gruppenzugehörigkeit eines Farbstoffes gestatten oder einem Pigment eine spezifische Natur zuzuschreiben erlauben.

Die Mehrzahl qualitativer Reaktionen beruht auf Farbenänderung durch äußere Faktoren. Als solche kommen das eine Abblassung oder Metachromasie bedingende Licht und der Sauerstoff der Luft in Betracht. Gewisse Farbstoffe, wie die Lipochrome, sind außerordentlich lichtempfindlich. Bisweilen führt die Einwirkung von Licht (Sonnenlicht) auch zur Farbenveränderung oder Farbenvertiefung. Man bedenke in diesem Fall die Möglichkeit einer Farbenbildung aus einem ungefärbten Chromogen, wie dies für Urobilin und Purpurin festgestellt ist. In solchen Fällen versuche man das Chromogen bei diffusem Petroleumlicht oder im Dunkeln darzustellen. Andere Veränderungen der ursprünglichen Eigenfarbe werden sehr leicht durch Wärme, Säuren oder Alkalien hervorgerufen. Auch hier ist zu beachten, ob es sich z. B. nach Ansäuern nur um einen Farbenumschlag handelt, der durch Neutralisieren der Lösung der ursprünglichen Farbe wieder weicht.

In solchen Fällen kann der Farbstoff unter Umständen durch Lösen und Umfällen aus Alkalien mit Säuren gereinigt werden. Die Mehrzahl der Farbstoffe niederer Tiere aber wird durch diese Agentien in ihrer elementaren Natur verändert. Die Farbenveränderung, die durch Alkalien, bisweilen aber schon durch Alkohol oder Äther auftritt, ist für manche Farbstoffe, wie z. B. die Uranidine, als Klassenmerkmal verwendet worden.

Das wertvollste Material der Farbstoffanalyse und Identifikation bietet die spektroskopische Beobachtung. In der Tat zeigen besonders die Farbstoffe der höheren Tiere (Blutfarbstoffe) und der Pflanzen (Chlorophyll) ganz spezifische und charakteristische Absorptionsspektren. Weniger günstig liegen die Verhältnisse bei den chemisch unaufgeklärten Farbstoffen aus der niederen Tierreihe. Doch sind auch hier die Spektralerscheinungen zum mindesten verwertbar, um einem Pigment eine Sonderstellung oder eine spezifische Natur zuzuerkennen. Man beachte dabei stets die Veränderungen der Absorptionsstreifen bei den durch Alkali oder Säure vermittelten Farbumschlägen, und prüfe auf die Wiederkehr des ursprünglichen Spektralbildes nach Neutralisation der Lösung. Liegen Farbstoffe vor, die in keinem der bekannten Lösungsmittel ohne Änderung ihrer chemischen Zusammensetzung löslich sind, so kann man diese Substanzen (Pigmentkörner) als Rückstand gewinnen, indem man vorher Fettsubstanzen durch Alkohol-Ätherextraktion und Proteinsubstanzen durch Zerkochen mit kochenden Säuren oder durch proteolytische Fermente beseitigt und den Pigmentrückstand schließlich gut wäscht. Befindet sich das Pigment nur locker in Gewebslücken enthalten, so kann man dasselbe auch mechanisch herauslösen, und dann die Beseitigung der Proteinverunreinigungen in der eben genannten Weise folgen lassen.

Es ist klar, daß bei mangelnden chemischen Kenntnissen über die tierischen Farbstoffe von einer Systematik derselben keine Rede sein kann. Eine Anordnung der hier in Frage stehenden Substanzen nach zoologischen Gesichtspunkten ist den speziellen Lehrbüchern dieser Wissenschaft vorbehalten. Eine Reihenfolge andrerseits, die nur nach dem Gesichtspunkt der Farbennuance gebildet ist, würde keinesfalls glücklich sein, wenn sie auch für die Pigmente der niedersten Tiere kaum zu vermeiden ist. Wir folgen daher einer Anordnung von eher physiologischen Rücksichten und besprechen die Farbstoffe in der Reihenfolge:

A. Farbstoffe in Sekreten und Gewebsflüssigkeiten (Drüsensekrete, Blut, Galle, Harn).

B. Farbstoffe in Geweben. In der zweiten Gruppe trennen wir in chemisch besser bekannte Gruppen: 1. Farbstoffe der Hämatinreihe, 2. Verwandte der Gallenfarbstoffe, 3. Farbstoffe der Harnsäuregruppe, 4. Lipochrome und 5. Uranidine. Für den Rest der Substanzen bleibt nur eine Reihenfolge nach Grundfarben, wobei wir die schwarzgefärbten Produkte als Melanine zusammenfassen.

Wir bemerken aber ausdrücklich, daß wir keineswegs die Methoden für jeden bereits mit einem oft schön klingenden Eigennamen belegten

Farbstoff wiedergeben, sondern nur die wirklich besser bekannten Vertreter jeder Gruppe, und zwar nur die methodische Gewinnung mit kurzer Angabe ihrer Eigenschaften erwähnen werden.

Über das Vorkommen der Farbstoffe in der Tierreihe vgl. die Tabellen bei *v. Fürth* (S. 517 l. c. 1, S. 551—560).

Spezieller Teil.

A. Farbstoffe in Sekreten und Gewebsflüssigkeiten.

I. Farbstoffe in Drüsensekreten.

Bei einzelnen niederen Tieren sind gefärbte Substanzen in spezifischen Drüsensekreten enthalten. Zu erwähnen sind das sogenannte Purpurin, der violette Farbstoff im Drüsensekret mancher Purpurschnecken und das Aplysiopurpurin im Sekret mancher Aplysienarten. Bei beiden Tieren enthält die Drüse ursprünglich ein oder mehrere Chromogene, die durch bestimmte äußere Einflüsse (Licht, Ferment) erst in den Farbstoff übergehen. In beiden Fällen handelt es sich um gelöste Farbstoffe. Ein ungelöster schwarzer Farbstoff, das sogenannte Sepia, findet sich im Tintenbeutelsekret mancher Sepienarten. Im Prinzip stellt auch der gelbe oder grüne Farbstoff der Seide (Seidenlipochrom) ein Sekretprodukt dar.

Es ist denkbar, daß auch andere Farbstoffe, die sich in der Haut oder den Integumenten abgelagert finden, das Produkt besonderer Sekretions- oder Exkretionsorgane sind. Wir fassen hier nur die nach außen sekretorisch abgeschiedenen Farbstoffe zusammen.

1. **Punizin.** Darstellung des Rohfarbstoffes aus dem bereits durch die Lufteinwirkung gefärbten Sekret, z. B. von Murex trunculus (*A.* und *G. de Negri* [1]): Die von der Muschel abgelösten Purpurdrüsen werden zerrieben, der Sonnenbestrahlung ausgesetzt und nach dem Violettwerden eingetrocknet. Der dann feingepulverte Gewebsrückstand wird mit heißem Eisessig behandelt, wobei der Farbstoff in Lösung geht. Die filtrierte Eisessiglösung wird mit Wasser verdünnt und der sich hierbei abscheidende Farbstoff in Chloroform aufgenommen. Als Verdunstungsrückstand des Chloroforms (bei Zimmertemperatur im Vakuum) hinterbleibt eine metallglänzende, blaurote Masse.

Die Substanz scheint nicht einheitlich zu sein, da ein Teil derselben mit roter Farbe in Äther löslich ist, während ein zweiter ätherunlöslicher Teil von blauer Farbe aus Alkohol kristallisiert erhalten werden kann.

Darstellung aus dem Chromogen von Purpura lapillus (*Schunck* [2]). Die Purpurdrüsen der Schnecke werden im Dunkeln mit Alkohol

[1]) *A.* und *G. de Negri,* Della materia colorante dei Murici e della porpora degli antichi. Atti della R. Università di Genova. Vol. 3. p. 96 (1875).

[2]) *E. Schunck,* Note on the purple of the ancients. Journ. chem. Soc. Vol. 35. p. 589 (1879); Vol. 37. p. 613 (1880).

versetzt und dann erst der Lichtwirkung ausgesetzt. Aus der alkoholischen Lösung scheidet sich hierbei der Purpurfarbstoff ab (etwa aus 400 Schnecken 7 *mg*), der aus heißem oder siedendem Anilin beim Abkühlen in Form von mikroskopischen, purpurfarbigen Sternchen ausfällt. Das Produkt soll einheitlich sein, doch wird diesem Befund von *Letellier*[1]) widersprochen.

Auch die Beobachtung von *Negri* von der Existenz zweier Körper steht hiermit im Widerspruch, steht aber mit der Möglichkeit, zwei differente Chromogene darzustellen, in guter Übereinstimmung.

Darstellung der Chromogene (*Letellier*[2]). Das Farbstoffchromogen befindet sich in dem gelblichweißen Band, das bei Purpura lapillus am Rektum entlang läuft. Einige Hunderte dieser Bänder werden im Vakuum getrocknet und mit Äther extrahiert. Das Ätherextrakt wird mit Kalilauge aufgenommen. Aus dieser Lösung fällt mit Essigsäure ein gelber Farbstoff, der aus Äther in Prismen des triklinen Systems kristallisiert. Zwei andere Chromogene werden dem Gewebe im Dunkeln durch Chloroform oder Petroläther entzogen. Der Rückstand der Extrakte wird immer noch im Dunkeln mit Wasser in eine wasserlösliche aschgraue Substanz und eine schwerer lösliche apfelgrüne Substanz fraktioniert. Beide werden wiederum in Chloroform aufgenommen. Die erstere kristallisiert in orthorhombischen, die letztere in klinorhombischen Prismen. Ihre Trennung gelingt auch durch die fraktionierte Extraktion, da Petroläther leichter die apfelgrüne, Chloroform leichter die aschgraue Substanz aufnimmt.

Qualitativer Nachweis des Chromogens (*Schunck*). Man erschöpft die Purpurdrüsen der Schnecke im Dunkeln mit Alkohol und Äther. Die gelben Extraktlösungen enthalten das Chromogen, das sich bei der Sonnenbestrahlung erst grün färbt und dann in ein sich abscheidendes purpurfarbenes Pulver verwandelt.

Einige Eigenschaften des Farbstoffes: Löslich in Chloroform, heißem Alkohol, Eisessig, Anilin, Essigsäureanhydrid. Grünfärbung beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure, Blaufärbung beim Verdünnen dieser Lösung mit Wasser. Empfindlichkeit unter Entfärbung gegen Oxydantien. Keine charakteristische Absorptionsstreifen. Über die chemische Natur des Farbstoffes steht nichts Sicheres fest. Diese Eigenschaften sind alle nur wenig gesichert, nachdem *Letellier*[3]) wenigstens für Purpura lapillus die Existenz dreier Pigmente festgestellt hat, von denen das eine gelb und lichtunempfindlich ist, das zweite, tiefgrüne in der Sonne blau und das dritte aschgrau, an der Luft karminrot wird.

---

[1]) *A. Letellier*, Untersuchungen über den Purpur von Purpura lapillus. Arch. de zool. exp. et gén. Notes et revue. (4.) T. 1. p. 25 (1903).

[2]) *A. Letellier*, Untersuchungen über den Purpur von Purpura lapilius. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. T. **109**. p. 82 (1890); T. **111**. p. 307 (1891); Arch. de zool. exp. T. **8**. pag. 361 (1889).

[3]) *A. Letellier*, Untersuchungen über den Purpur von Purpura lapillus. Arch. de zool. exp. et gén. Notes et revue. (4.) T. **1**. p. 25 (1903).

Purpurfarbstoff von Murex brandaris ist durch *Friedländer* [1]) als 6.6′-Dibromindigo aufgeklärt.

Darstellung: Die herauspräparierte Drüse der Schnecke wird auf Filtrierpapier gestrichen und durch Sonnenbestrahlung während einer Stunde der Farbstoff entwickelt. Danach wird die gefärbte Papiermasse durch halbstündiges Erwärmen auf dem Wasserbad mit verdünnter Schwefelsäure (1:2) mazeriert. Der Brei wird alsdann mit heißem Wasser gewaschen, auf der Nutsche gesammelt und zur Entfernung von Verunreinigungen im Soxhlet mit Alkohol erschöpft. Hierauf wird der Farbstoff mit kochendem Benzoesäureäthylester extrahiert, aus welchem er beim Erkalten in flimmernden, kupferglänzenden Kristallen ausfällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Benzoeäther oder Chinolin, wegen der Schwerlöslichkeit am besten durch Extraktion aus einer Soxhlethülse, die in dem Kolben unter dem Kühler aufgehängt ist.

Ausbeute 1·4 *g* aus 12.000 Schneckendrüsen.

Die Eigenschaften und die analytischen Zahlen dieses Körpers stimmen vollkommen mit dem 6.6′-Dibromindigo überein. C 45·92, H 2·13, N 6·63, Br 37·40%, unlöslich in der Mehrzahl [2]) organischer Solventien, löslich in der Hitze in Nitrobenzol, Anilin, Benzoesäure, Chinolin, Acetylentetrachlorid. In letzterem Lösungsmittel zeigt er bei 120—130° einen Absorptionsstreifen im Orange ($\lambda = 603\ \mu\mu$) allmählich bis $\lambda = 565\ \mu\mu$. Inwieweit bereits *Schunck* den gleichen Körper aus Purpura lapillus in Händen hatte, läßt sich nicht entscheiden. Auch ist es denkbar, daß andere Purpurschneckenarten einen anders zusammengesetzten Farbstoff enthalten. Jedenfalls aber dürfte auch dieser zu den Indigofarbstoffen zählen.

2. **Aplysiopurpurin.** Im Sekret der Drüsen von *Bohatsch* der Aplysien findet sich ein Chromogen, das allmählich von kastanienbraunen über blaue, blaurotviolette in gelbbraune Farbentöne übergeht. An der Farbbildung sind vermutlich Luftsauerstoff und Fermente beteiligt.

Isolierbar ist der blaue Farbstoff durch Ausschütteln der angesäuerten Lösung mit Chloroform und Abdunsten des Chloroforms.[3]) Der violette Farbstoff (das Aplysiopurpurin) kann in Alkohol (*Moseley* [4]) oder Wasser aufgenommen werden. Er ist aus alkoholischer Lösung durch Kochsalz (*Ziegler* [5]), aus wässeriger Lösung durch Ammoniumsulfat (*Mac Munn* [6]) bei Ganzsättigung fällbar.

---

[1]) *P. Friedländer,* Über den antiken Purpur. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. **42**. S. 785 (1909); vgl. hierzu Monatsh. f. Chem. Bd. **28**. S. 991 (1907).

[2]) *Fr. Sachs* und *R. Kempf,* Chem. Ber. Bd. **36**. S. 3303 (1903). — *Fr. Sachs* und *E. Sichel*, ibidem. Bd. **37**. S. 1868 (1904).

[3]) *A.* und *G. de Negri*, Über die färbende Substanz der Aplysien. Atti della R. Università di Genova. T. **3**. p. 11 (1875).

[4]) *H. N. Moseley,* Über Farbstoffe verschiedener Tiere. Quart. Journ. Microsc. Science. T. **17**. p. 12 (1877).

[5]) *M. Ziegler,* Bemerkung über das natürliche Anilin. Bull. de la Soc. industrielle de Mulhouse. T. **37**. p. 283 (1887); Journ. f. prakt. Chem. Bd. **103**. S. 63 (1868).

[6]) *C. H. Mac-Munn,* Die Pigmente von Aplysia punctata. Journ. of Phys. Vol. **24**. p. 1 (1899).

Über die chemische Natur dieser Substanz ist bei ihrer Labilität nichts bekannt. Die Zugehörigkeit zu Anilinfarbstoffen ist hypothetisch. Sie zersetzt sich in der Lösung auch im Dunkeln unter Bildung eines ätherlöslichen Aplysiocyanins.

Spektralverhalten: *(Mac Munn-Moseley)* in wässeriger Lösung:

Breites Absorptionsband bei F, ein heller Streifen zwischen D und E, der in großer Verdünnung verdoppelt erscheint. Für das rote Pigment von Aplysia depilans und Aplysia punctata gibt *Briot* [1]) ein anderes Spektralbild an: 2 Absorptionsstreifen, die zwischen D und E und zwischen b und F liegen. In saurer, wässeriger Lösung ist der erste Streifen nach E verbreitert, der zweite Streifen unverändert, in ammoniakalischer Lösung besteht nur 1 Streifen.

Das Farbenspiel des natürlichen Sekretes erinnert an die interessanten Beobachtungen von *Abderhalden* und *Guggenheim* [2]) über die Färbungen von tyrosinhaltigen Polypeptiden durch Tyrosinaseferment. Auch dort sind schöne Farben beobachtet. Es wäre denkbar, daß sich auch in den Aplysiensekreten solche Polypeptide vorfinden, deren Färbung durch Fermente des Sekretes hervorgerufen würden. Jedenfalls ist hier auffallend, daß die Farbenveränderung nicht durch Licht oder Luft bedingt ist, da die Umsetzung auch bei Ausschluß derselben fortschreitet.

3. **Sepiaschwarz** im Tintensekret der Cephalopoden (z. B. Octopus vulgaris). Der als Sepia bezeichnete schwarze Farbstoff, der vermutlich durch einen Fermentvorgang (tyrosinaseähnliches Ferment) aus einem ungefärbten Chromogen (vermutlich ein tyrosinhaltiges komplexes Eiweißderivat) entsteht, findet sich in Form feinster Pigmentkörnchen ungelöst im Tintenbeutelsekret.

Darstellung: Die ein Filter leicht passierenden Körnchen werden durch Aufkochen unter Zusatz einiger Tropfen Kalilauge filtrierbar gemacht (vielleicht geht hierbei schon eine chemische Veränderung vor sich). Das abgesetzte Pigment bleibt dann tagelang unter verdünnter KOH und verdünnter HCl stehen und wird dann mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Nach *Girod* [3]) behandelt man der Reihe nach mit Alkohol, Äther, Wasser, Eisessig, verdünnter Kaliumkarbonatlösung, verdünnter Salzsäure und zuletzt warmem Wasser. Der Rückstand wird zuletzt getrocknet.

Nencki und *Sieber* [4]) behandeln das Tintenbeutelsekret oder die getrockneten, fein zermahlenen Tintenbeutel mit 10%iger Kalilauge bei

---

[1]) *A. Briot,* Über das rote Sekret der Aplysien. Compt. rend. soc. biol. T. **56**. p. 899 (1904).

[2]) *E. Abderhalden* und *M. Guggenheim,* Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus Russula delica auf Tyrosin, tyrosinhaltige Polypeptide und einige andere Verbindungen unter verschiedenen Bedingungen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **54**. S. 331 (1907).

[3]) *P. Girod,* Chemische Untersuchungen über das Sekretionsprodukt des Tintenbeutels bei den Cephalopoden. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. T. **93**. p. 96 (1881); T. **101**. p. 1372 (1885).

[4]) *M. Nencki* und *N. Sieber*, Weitere Beiträge zur Kenntnis der tierischen Melanine. Arch. f. exp. Pharm. u. Pathol. Bd. **24**. S. 21 (1887).

Wasserbadtemperatur. Das in Lösung gehende Pigment (Sepiasäure) ist ein Umwandlungsprodukt des Sepiaschwarz und wird durch Umfällen mit Säure aus alkalischer Lösung in NaOH, später in NH_3 gereinigt und zur Abscheidung gebracht (vgl. hierzu den Abschnitt: Melanine, S. 762, wo sich eine Kritik dieser Methoden findet).

Zusammensetzung nach *Girod*: C 53·6, H 4·02, N 8·6%, *Nencki* und *Sieber*: C 56·36, H 3·56, N 12·21, S 0·51%.

4. **Lipochrome** der Seide (vgl. bei Lipochrome, S. 758). Ein grüner Farbstoff der Seide von Antherea, Yama-Mai und Rhodia fugax[1]) geht in Alkohol über, und kristallisiert aus Alkohol in blauer, aus Wasser in grüner Farbe. Das Spektrum in alkoholischer Lösung gleicht jenem des Chlorophylls, verschwindet aber mit Alkalien und Schwefelammonium *(Villard)*.[1])

II. Farbstoffe im Blut.

Hämoglobin und seine Derivate sind in einem besonderen Kapitel besprochen.

Im Blut niederer Tiere finden sich außer dem mit dem Warmblüterhämoglobin identischen Hämoglobin einige gefärbte Substanzen, die nicht der Gruppe der Hämatinderivate angehören, vielmehr, soweit unsere Kenntnisse reichen, chemisch eigenartige Substanzen darstellen. Zu erwähnen wären ein Echinochrom gewisser Echinodermen, ein Chlorocruorin im Blut von Anneliden (Siphonostoma), ein Hämerythrin einiger Sipunculusarten, das Hämocyanin gewisser Mollusken und Crustaceen, das Hämorrhodin der Aplysia depilans, das Tetronerythrin bei höher organisierten Crustaceen, die Melanosen in der Körperflüssigkeit der Insekten und die Lipochrome im Blutserum der Warmblüter.

Einzelne dieser Körper erwiesen sich bei genauerer Untersuchung als schwermetallhaltige Eiweißkörper, die zwar die Fähigkeit der Sauerstoffbindung wie das Hämoglobin besitzen, aber nur zum Teil einen dem Hämoglobin oder Hämatin ähnlichen Aufbau aus einem metallhaltigen Chromogen und einer globinähnlichen Eiweißkomponente aufweisen.

Die Darstellung dieser Körper ist eine relativ leichte und erfolgreiche. Ihre Besprechung sei daher vorangestellt.

1. **Hämocyanin** aus dem Blut von Mollusken (z. B. Octopus) ist der Träger der blauen Farbe im arteriellen Molluskenblut. Über die technischen Einzelheiten zur Gewinnung von Octopusblut vgl. bei *v. Uexküll*.[2])

Darstellung aus arteriellem Octopusblut (*Griffiths*[3]): Man fängt das Blut durch Anschneiden des arteriellen Gefäßes auf und zentrifugiert

---

[1]) *J. Villard,* Über das angebliche Chlorophyll der Seide. Compt. rend. soc. biol. T. **56**. p. 1034 (1904); Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. T. **139**. p. 165 (1904).

[2]) *L. Frédericq,* Recherches sur la physiologie de poulpe commun. Arch. de Zool. expér. T. 535 (1878); vgl. auch hierzu Biochem. Zeitschr. Bd. 19. pag. 393 (1909). — Vgl. bei *J. Hyde,* Beobachtungen über die Sekretion der sogenannten Speicheldrüse von Octopus. Zeitschr. f. Biol. Bd. **35**. S. 459; vgl. S. 717. Nr. 1. S. 279 u. 62.

[3]) *A. B. Griffiths,* Über die Zusammensetzung des Hämocyanins. Comptes rend. de l'Acad. des Sciences. T. **114**. p. 496 (1892).

scharf ab. Das Blut wird alsdann mit einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung gefällt. Der entstehende Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung gewaschen, hierauf in Wasser gelöst und entweder durch Alkohol oder durch Koagulation (Koag.-Temp. 68—70°) gefällt. Nach *Henze* fällt man das Hämocyanin nach Verdünnen des zentrifugierten und filtrierten Blutes mit Wasser durch Alkohol und gleichzeitiges Erwärmen. Durch mehrfaches Dekantieren wird der fein verteilte Niederschlag gewaschen und auf einem Seidenfilter mit Wasser, Alkohol und Äther behandelt.

Der Körper ist einheitlich, da er das einzige Blutprotein des Tieres ist.

Darstellung in kristallisierter Form (*Henze*[1]). Das zentrifugierte klare Octopusblut wird mit soviel gesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt, daß eben eine Niederschlagstrübung eintritt: diese wird eben wieder durch Wasserzusatz gelöst. Durch Zusatz von wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure wird eine neue Trübung erzeugt. Nach halbtägigem Stehen hat sich ein Kristallbrei zu Boden gesetzt, der auf einem Seidenfilter gesammelt und mit einer Lösung von 7 Teilen Wasser und 3 Teilen gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen wird. Will man analysenreine Präparate, so löst man die Kristalle in der eben ausreichenden Menge Wasser, dialysiert gegen destilliertes Wasser bis zur Schwefelsäurefreiheit und koaguliert die Lösung (meist 3·36%) durch Erwärmen auf 70° aus. Hierauf reinigt und trocknet man mit Wasser, Alkohol und Äther.

Elementarzusammensetzung: C 53·66, H 7·33, N 16·09, S 0·86, Cu 0·38%. Koag.-Temp. 68—70° in 1·5%iger, salzfreier Lösung.

Der Körper, der durch ein hohes Sauerstoffbindungsvermögen ausgezeichnet ist (gemessen nur am Octopusblut, *Griffiths*[2]) enthält Kupfer in lockerer Bindung, ähnlich wie die Metallalbuminate. Dasselbe wird durch verdünnte Säuren leicht abgespalten und ist durch Ferrocyankali dann nachweisbar. Der zurückbleibende Körper stellt ein Acidalbuminat dar (C 53·01, H 7·64, N 16·04%). Das Hämocyanin hat keine dem Hämoglobin ähnliche Konfiguration, da die Abspaltung einer hämatinhaltigen Komponente nicht erfolgt.

2. **Hämocyanin** aus Crustaceenblut findet sich neben einem roten Farbstoff (Tetronerythrin siehe unten) und anderen farblosen Proteinen im Blut höherer Crustaceen. Es ist nur bei einigen Gliedern dieser Tierklasse vorhanden (Homarus Maja, Portucuco u. a.).

Darstellung: *Halliburton.*[3]) Man versetzt das sauerstoffgesättigte Blut mit Magnesiumsulfat oder Natriumchlorid zu Ganzsättigung und unterstützt die nur langsam erfolgende Aussalzung durch 12—36 Stunden dauern-

---

[1]) *M. Henze,* Zur Kenntnis des Hämocyanins. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **33**. S. 370 (1901); desgl. II. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 290 (1904).

[2]) *A. B. Griffiths,* Über das Blut der Avertebraten. Proc. roy soc. of Edinburgh. Vol. **18**. p. 288 (1890).

[3]) *W. D. Halliburton,* Über das Blut von decapoden Crustaceen. Journ. of phys. T. **6**. p. 300 (1885).

des Schütteln. Es entsteht eine Fällung (quantitativ nur durch $MgSO_4$), die man auf dem Filter mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung wäscht und in Wasser wieder löst. Eine Abscheidung erfolgt dann durch Koagulation bei 65 bis 70°. Zur vollkommenen Abscheidung ist mehrstündiges Erwärmen auf diese Temperatur nötig.

Die an der Luft blaue Substanz ist, wie das Hämocyanin der Mollusken, ein Metallalbuminat-ähnlicher Körper. Die Einheitlichkeit des so dargestellten Körpers ist nicht gesichert. Da der Körper durch Dialyse, Wasserverdünnung und CO_2-Sättigung seiner Lösung und auch durch verdünnte Essigsäure gefällt wird, scheint er Globulincharakter zu besitzen, vorausgesetzt, daß er nicht einem fremden Globulin nur beigemischt ist, und diese Möglichkeit ist noch nicht im negativen Sinne entschieden. Das Sauerstoffbindungsvermögen, gemessen an der Leichtigkeit der Sauerstoffabgabe durch reduzierende Mittel, scheint ein von Spezies zu Spezies verschiedenes.

Die Identität mit Molluskenhämocyanin ist nicht sicher, eine Entscheidung wird erst möglich, wenn eine Reindarstellung des Crustaceenhämocyanins gelungen ist.

Die folgenden gefärbten eiweißhaltigen Substanzen haben gleichfalls die Fähigkeit der Sauerstoffbindung, haben also biologisch respiratorische Pigmentfunktion. Sie sind bisher nicht mit Sicherheit rein dargestellt. Durch die Analyse der Spektroskopie aber ist ihre Verwandtschaft mit dem klassischen Hämatinkomplex sehr wahrscheinlich gemacht.

3. **Echinochrom** findet sich in den Zellelementen der Perivisceralflüssigkeit gewisser Echinodermen (u. a. Sphaerechinus sphaera) (*Mac Munn*[1], *Griffiths*[2]). Zur Darstellung bereitet man ein Extrakt des die gefärbten Zellen einschließenden, vorher getrockneten Blutgerinnsels mit Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform oder Benzin oder Schwefelkohlenstoff. Eine Analyse des amorphen Abdampfrückstandes aus Chloroform, Benzin oder Schwefelkohlenstoffextrakten führt zu der bis jetzt unbewiesenen Formel $C_{120}H_{99}N_{12}FeS_2O_{12}$.

Das Spektralverhalten wechselt mit dem Lösungsmittel. Durch Kochen mit Mineralsäuren soll das Spektrum des Hämochromogens bzw. Hämatoporphyrins entstehen. Eine respiratorische Funktion kommt dem Farbstoff nicht zu (*Winterstein*).[3])

4. **Chlorocruorin** ist ein grüner Farbstoff, der aus dem Blut mancher Anneliden gewonnen werden kann (u. a. Siphonostoma, Spirographis Spallanzani, Sabellaarten), *Lancester*[4]), *Griffiths*[5]).

---

[1]) *C. A. Mac Munn*, Über die Färbung des Blutes einiger Avertebraten. Quart. Journ. of microsc. Science. T. **25**. p. 469 (1885).

[2]) *A. B. Griffiths*, Über Echinochrom, ein respiratorisches Pigment. Comptes rend. de l'Acad. des Sciences. T. **115**. p. 419 (1892).

[3]) *H. Winterstein*, Zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere. Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 348 (1909).

[4]) *R. Lancester*, Journ. of Anat. u. Phys. Vol. **2**. p. 114 (1867); ibid. Vol. **3**. p. 119 (1870); vor allem Vol. **4** p. 119 (1869).

[5]) *A. B. Griffiths*, Über die Zusammensetzung des Chlorocruorins. Comptes rend. de l'Acad. des Sciences. T. **114**. p. 1277 (1892).

Man fällt das Blut z. B. von Sabella mit Alkohol. Die entstehende Fällung löst man in einer verdünnten Lösung von $MgSO_4$. Durch Sättigen mit $MgSO_4$ erhält man einen gefärbten Niederschlag, der auf dem Filter mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen wird. Die Lösung des Filterrückstandes in Wasser wird durch Erwärmen auf 56—57° koaguliert. Das grün gefärbte Filtrat dieser Proteinkoagulate wird mit Alkohol gefällt. Der entstandene Niederschlag wird mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Elem. Zus.: C 54·25, H 6·82, N 16·16, Fe 0·45, S 0·78%. Die Reinheit des Körpers ist durch diese Darstellungsmethode nicht garantiert. Der Körper hat wie das Hämoglobin ein Sauerstoffbindungsvermögen und zeigt in wässeriger Lösung spez. Absorptionsstreifen eines Chlorocruorins und eines Oxychlorocruorins:

Oxychlorocruorin: 1 Streifen zwischen C und D (λ 618—598), ein zweiter Streifen zwischen D und E (λ 576—584), in ihrer Lage nicht mit den Streifen des Oxyhämoglobins übereinstimmend.

Durch vorsichtige Reduktion entsteht ein Streifen des Chlorocruorins, entsprechend den oben genannten dunkleren Streifen zwischen C und D. Durch vorsichtige weitere Reduktion entsteht anscheinend ein reduziertes Chlorocruorin *(Lancester)*, durch noch weitere Reduktion mit Schwefelammonium erscheinen schließlich die Absorptionsstreifen des reduzierten Hämatins.

In Analogie zu diesen qualitativen Proben stehen die Beobachtungen *(Griffiths)*, daß Chlorocruorin durch Einwirkung von Säuren oder Alkalien in Eiweiß, Hämatin und Fettsäuren gespalten wird.

5. **Pinnaglobin** im Blut von Pinna squamosa *(Griffiths)*[1]: Das defibrinierte Blut wird mit Alkohol gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wird in verdünnter Magnesiumsulfatlösung gelöst und durch Sättigen mit $MgSO_4$ wieder ausgefällt. Der neue Niederschlag wird auf dem Filter mit gesättigter Salzlösung gewaschen, in Wasser gelöst und durch Erhitzen der Lösung auf 56° von Albuminstoffen befreit. Das in Lösung befindliche Globulin des Filtrates wird zur Reinigung mit Alkohol gefällt, mit Wasser gewaschen und bei 60° dann im Vakuum getrocknet. Das Pinnaglobulin, das im Blut in farbloser Vorstufe vorhanden ist, und erst durch die Sauerstoffbindung an der Luft in ein bräunliches Pigment übergeht, ist wie das Hämocyanin ein respiratorisches Pigment. Es enthält als Metallkomponente Mangan. Elementare Zusammensetzung: C 55·7, H 6·24, N 16,24, S 0·81, Mn 0·35, O 21·29%.

Ähnliche respiratorische Globuline finden sich im Blut von Gastropoden: Patella vulgata, Chiton, Doris und verschiedenen Tunicaten (letztere als γ-Achroglobine[2]) bezeichnet). Diese respiratorischen Substanzen sind

[1]) *A. B. Griffiths,* Über die Zusammensetzung von Pinnaglobin, ein neues Globulin. Comptes rend. de l'Acad. des Sciences. T. **114**. p. 840 (1892).

[2]) *Griffiths,* Comptes rend. de l'Acad. des Sciences. T. **115**. p. 359, 474, 738 (1892). T. **116**. p. 1206 (1893).

ungefärbt und metallfrei. Ihre Darstellung erfolgt nach der für Pinnaglobulin angegebenen Methode. Die Achroglobine sind manganfrei. Die Existenz solcher Körper ist bis jetzt unbewiesen.

6. **Hämerythrin** ist ein roter Farbstoff in den Blutkörperchen und der perienterischen Flüssigkeit mancher Würmer (Sipunculus nudus, Sipunculus Gauldii, Phascolosoma). Seine Darstellung versuchte *Griffiths*[1]) nach dem für Chlorocruorin mitgeteilten Verfahren.

Der Körper kann qualitativ leicht nachgewiesen werden, da er durch Verreiben der Blutzellen (die sich aus dem spontan gerinnenden Blut oder der perienterischen Flüssigkeit als obere Schicht absetzen) mit Wasser in Lösung geht.

Der Körper ist eisenhaltig und schwefelhaltig, gibt aber kein charakteristisches Absorptionsspektrum. Der Körper hat jedenfalls ein hohes Sauerstoffbindungsvermögen, so daß er Oxyhämoglobin zu reduzieren vermag *(Krukenberg)*.

7. **Tetronerythrin** ist ein roter Farbstoff, der sich in wechselnder Menge im hämocyaninhaltigen Blut höherer Crustaceen vorfindet.

Darstellung aus Krabbenblut *(Halliburton)*.[2])

Man fängt das Blut frisch auf und versetzt es zu maximaler Fällung mit Alkohol. Das rot gefärbte Filtrat der Eiweißfällung wird eingedampft, wobei sich der Farbstoff flockig abscheidet. Derselbe wird in Alkohol oder Äther gelöst und nach dem für Lipochrome gültigen Verfahren (vgl. S. 758 ff.) gereinigt.

Der Körper zeigt vollständig die Eigenschaften der Lipochrome und Tetronerythrine anderer Provenienz (vgl. daher bei Lipochromen S. 758 ff.).

Der Körper hat, soweit bis jetzt bekannt, keine respiratorische Pigmentfunktion. Er ist bei Crustaceen außer im Blut auch im Skelett und der Hypodermis enthalten (siehe Crustaceorubin S. 760).

8. **Melanosen** im Blut und der Hämolymphe von Insekten sind Chromogene, die unter dem Einfluß tyrosinaseähnlicher Fermente in dunkel bis schwarz gefärbte Pigmente übergehen. Über ihre chemische Natur ist nichts Sicheres bekannt *(v. Fürth)*. Vermutlich handelt es sich um komplexe, Tyrosin oder zum mindesten aromatische Kerne enthaltende Eiweißderivate.

9. Über die Farbstoffe im Warmblüterblut (Hämoglobin etc.) und über Lipochrome s. S. 339 und S. 617.

III. Farbstoffe der Galle.

Die Methoden der Darstellung von Gallenfarbstoffen sind in dem Spezialkapitel: „Gallenfarbstoffe und Abbauprodukte“ (vgl. S. 635) einge-

[1]) *A. B. Griffiths*, Das Hämerythrin, ein respiratorisches Pigment im Blut gewisser Würmer. Comptes rend. de l'Acad. des Sciences. T. **115**. p. 669 (1892).

[2]) *W. D. Halliburton*, Journ. of phys. Vol. **6**. p. 300 (1885); l. c. S. 725. Note 3.

hend beschrieben. Es erübrigt sich hier eine eingehende Besprechung. Hingegen sollen die Derivate dieser Farbstoffe, und vor allem die Methoden ihrer Darstellung aus tierischen Flüssigkeiten, ihrer qualitativen und quantitativen Bestimmung besprochen werden.

Die Galle der Menschen und Tiere hat eine goldgelbe oder grüne Farbe, die durch die Anwesenheit mehrerer Gallenfarbstoffe bedingt ist. Nur ein Teil dieser gefärbten Substanzen ist bis jetzt aus der frischen, physiologischen Galle isoliert. Die Mehrzahl derselben ist aus der Leichengalle oder aus pathologischen, die Farbstoffe einschließenden Konkrementen dargestellt.

Als Gallenfarbstoffe sind isoliert und genauer studiert: Das Bilirubin, Biliverdin (beide auch in der normalen Galle enthalten), das Choleprasin, Bilifuscin, Biliprasin, Bilicyanin und Choletelin.

Außer diesen Substanzen sind noch ein Cholohämatin und ein Bilipurpurin dargestellt worden.

Ob die genannten Farbstoffe alle mehr oder weniger oxydierte Derivate eines einheitlichen, als Muttersubstanz fungierenden Bilirubins sind, ist noch nicht mit aller Sicherheit festgestellt. Nur für einige von ihnen gilt diese Genese als bewiesen. Daß die Gallenfarbstoffe im weiteren Sinn Derivate und Verwandte des Blutfarbstoffs sind, darf auf Grund der chemischen Studien über die Konstitution dieser Körper bzw. ihrer einfacheren Derivate als sichergestellt gelten. Ebenso ist eine Beziehung zu pflanzlichen Chlorophyllen wahrscheinlich. Allen drei Farbstoffen ist ein gemeinsamer Grundkomplex der Konfiguration eigen. Die Konstitution der Gallenfarbstoffe selbst ist aber noch nicht aufgeklärt.

I. Darstellungsmethoden für die natürlichen Gallenfarbstoffe.

Bilirubin, das sich physiologisch in der Lebergalle aller Vertebraten, der Blasengalle des Menschen und der Fleischfresser, im Dünndarminhalt, im Blutserum des Pferdes, in ikterischen Geweben und Harn findet, wird am besten aus Kalkkonkrementen der Gallenblase, in denen es als Bilirubinkalk enthalten ist, dargestellt. Die größten Ausbeuten liefern die selteneren Gallensteine des Rindes und des Pferdes. Detaillierte Beschreibung der Methode in Kap. Gallenfarbstoffe etc., S. 635 ff.

Biliverdin findet sich neben Bilirubin im ikterischen Harn, in der Ochsengalle und am Rande der Hundeplazenta. Eine Isolierung aus dieser natürlichen Form als reiner Körper ist noch nicht gelungen. Als oxydatives Umwandlungsprodukt ist Biliverdin zugänglicher (siehe unten).

Choleprasin[1]) findet sich neben Bilirubin in Gallensteinen vom Rind. Über seine Darstellung siehe Kap. Gallenfarbstoffe etc., S. 637.

---

[1]) *W. Küster*, Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **47**. S. 294—322 (1906).

Bilifuscin *(v. Zumbusch)* [1], Biliprasin *(Staedeler* [2]), *Dastre* und *Floresco)* [3], Bilicyanin *(Heynsius* und *Campbell)* [4] und Choleverdin oder Cholecyanin *(Stokvis)* [5]) sind gleichfalls Farbstoffe, die aus Galle oder Gallensteinen dargestellt sind. Es ist unwahrscheinlich, daß diese Substanzen primäre spezifische Gallenfarbstoffe sind. Vielmehr muß man sie als Umwandlungsprodukte des vorgenannten primitiven Gallenfarbstoffes, des Bilirubins, auffassen. *Küster* hält dieselben nicht für chemische Individuen, sondern für Gemische.

Die Besprechung dieser mangelhaft untersuchten Körper erübrigt sich an diesem Ort.

2. Isolierung der gelösten Gallenfarbstoffe.

Um die Gallenfarbstoffe aus Lösungen (frische Galle, ikterischer Harn, Mageninhalt, wässerige Auszüge von Geweben oder Fäces) zu isolieren und unter Umständen qualitativen Proben oder der Identifikation zugänglich zu machen, fällt man die Lösung mit einer mäßigen Menge von Kalkmilch unter kräftigem Umschütteln (fürchtet man die Anwesenheit von Blutfarbstoff, der durch überschüssige Kalkmilch in Hämatin verwandelt würde und durch seine Kalkfällbarkeit die Gallenfarbstoffe verunreinigen resp. ihre qualitativen Proben zweideutig gestalten könnte, so leitet man sofort nach der Kalkfällung zur Bindung des überschüssigen Kalkhydrates gasförmige Kohlensäure ein). Den entstandenen Niederschlag wäscht man auf dem Filter gut aus, bringt ihn unter Alkohol, fügt dann Chloroform hinzu und zersetzt in dieser Mischung die Kalksalze mit Essigsäure, hierauf bringt man durch Wasserzusatz den Chloroformextrakt zur Abscheidung, filtriert ihn und überläßt ihn der Verdunstung. Der Verdunstungsrückstand wird durch Waschen mit Alkohol und Äther gereinigt. Schnelles Arbeiten ist ratsam.

Ist die als Kalksalz gefällte Gallenfarbstoffmenge eine große, so kann man die Kalkfällung nach dem Waschen trocknen und die ganze Salzmasse nach der für Kalkkonkremente gültigen Methode weiter verarbeiten.

3. Methoden zum qualitativen Nachweis und zur Identifikation der Gallenfarbstoffe.

Es liegt außerhalb des Rahmens dieser Abhandlung, die große Zahl der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Gallenfarbstoffe (Bili-

---

[1]) *L. R. v. Zumbusch,* Über das Bilifuscin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 446 (1901).

[2]) *G. Staedeler,* Annalen der Chemie. T. **132**. p. 328.

[3]) *A. Dastre* und *N. Floresco,* Neue Gallenfarbstoffe. C. r. de l'Acad. T. **125**. p. 581. 1897.

[4]) *A. Heynsius* und *G. Campbell, Pflügers* Archiv. T. **4**. S. 497 (1871).

[5]) *B. Stokvis,* Zentralbl. d. med. Wissensch. S. 241 (1868).

rubin) wiederzugeben. Wir teilen nur diejenigen Reaktionen mit, die dem Nachweis direkt dienlich sind und fügen einige für die Identifikation verwertbare Daten (Spektralerscheinungen, Löslichkeit, charakteristische Salze) bei.

Zum Nachweis der Gallenfarbstoffe in tierischen Flüssigkeiten und Geweben verwandelt man dieselben (Bilirubin, Choleprasin, Biliverdin etc.) durch Oxydation in andere Farbstoffe von charakteristischer Farbenqualität.

In manchen Fällen kommen diese Proben direkt an dem gefärbten Sekret zur Ausführung, in anderen Fällen (Blut, Anwesenheit von Blutfarbstoff) müssen die Gewebsflüssigkeiten erst vorbereitet werden. Bei der Anstellung der Proben sind folgende Punkte vorher zu berücksichtigen:

1. In nicht zu eiweißreichen, tierischen Flüssigkeiten, die frei von Blutfarbstoff sind, stört der Eiweißgehalt nicht.

2. Die Anwesenheit von Blutfarbstoff erfordert eine Fällung der Gallenfarbstoffe als Kalksalze (siehe oben sub II). Aus dem entstehenden Niederschlag werden die Farbstoffe in der beschriebenen Weise extrahiert. Man kann auch die Proben direkt mit dem Niederschlag ausführen oder denselben in dem Reagens von *Hammarsten* lösen (siehe unten).

3. In eiweißreichen Flüssigkeiten (Blutserum) fällt man die Proteinstoffe mit Alkohol. Die Lösung wird dann mitsamt dem Niederschlag mit einer Spur von Salzsäure oder Schwefelsäure gekocht. Das smaragdgrüne Filtrat kann dann direkt geprüft werden.

4. Stark ikterischer Harn bedarf keiner weiteren Vorbereitung. Man kann die Farbenproben direkt an einer Harnprobe oder an dem Rückstand eines Chloroformextraktes oder an einer Kalkfällung der Farbstoffe vornehmen.

Die Eigenfarbe des Harns oder der Indikanreichtum ist bisweilen für die Wahl der zur Verfügung stehenden Proben entscheidend.

5. Den tierischen festen Geweben entzieht man den Farbstoff (Bilirubin) durch Kochen mit Alkohol.

Generelle Gallenfarbstoffreaktion.

1. Die Reaktion nach *Gmelin.* Eine kleine Menge der zu prüfenden wässerigen Lösung wird vorsichtig mit einer Lösung von konzentrierter Salpetersäure, welche etwas salpetrige Säure enthält, unterschichtet. An der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten treten nacheinander Ringe von farbigen Schichten auf, die von oben nach unten gerechnet die Reihenfolge von Grün, Blau, Violett, Rot und Rotgelb aufweisen. Charakteristisch ist die Grünfärbung und das Rotviolett, da ohne diese eine Verwechslung mit Lipochromen möglich ist. Die ganze Reaktion soll langsam im Farbenspiel fortschreiten, was nur durch ein gewisses Minimum von salpetriger Säure zu erreichen ist. Alkoholanwesenheit stört die Beurteilung der Probe.

Die Empfindlichkeit ist eine außerordentliche (1 Bilirubinalkali : 80.000 Flüssigkeit).

2. Reaktion von *Hammarsten.*[1]) Man verwendet ein zum mindesten für 1 Jahr dauerhaftes Gemisch von 1 Volum 25%iger Salpetersäure und 19 Volumina 25%iger Salzsäure, das durch Stehen gelblich geworden ist. Kurz vor Ausführung der Probe mischt man 1 Volum der Säurelösung mit 4 Volumina Alkohol. Zu einigen Kubikzentimetern dieser Säurelösung läßt man die auf Bilirubin zu prüfende Lösung tropfenweise hinzu. Im Fall der Bilirubinanwesenheit entsteht nach wenigen Tropfen eine dauerhafte Grünfärbung. Durch steigenden Zusatz des Säurereagens kann man schrittweise sämtliche Farben der *Gmelin*schen Farbenskala hervorrufen.

Die Probe ist für Bilirubin typisch, bedarf aber einer bestimmten Minimalkonzentration des Bilirubins. Bei Verwendung von Harn fällt man daher den Farbstoff erst in der oben beschriebenen Weise als Kalksalz und löst den Kalkniederschlag direkt in dem Reagens.

3. Reaktion von *Huppert*[2]) auf Bilirubin. Man fällt das in Lösung befindliche Bilirubinalkali durch Kalkmilch bzw. Chlorcalcium + Ammoniak oder aus schwach saurer Lösung (Harn) durch das gleiche Volumen einer 10%igen Chlorbaryumlösung. Den entstehenden Niederschlag sammelt man auf einem Barytfilter oder durch Zentrifugieren. Der noch feuchte, von der Flüssigkeit getrennte, eventuell mit Wasser gewaschene Niederschlag wird mit schwach salzsaurem Alkohol längere Zeit zum Sieden erhitzt. Bilirubinanwesenheit ruft eine smaragdgrüne bis blaugrüne Färbung hervor.

Modifikation von *Nakayama.*[3]) Man fügt zu dem genannten Kalk- oder Barytniederschlag eine Probe einer Lösung von 99 Teilen 95%igem Alkohol + 1 Teil roher rauchender Salzsäure + 4 *g* Eisenchlorid pro 1 *l* der Alkohol-Säuremischung. Nach dem Sieden wird die Lösung grün bis blaugrün, nach vorsichtigem Zusatz rauchender Salpetersäure zu der blaugrünen Lösung geht die blaue Farbe in Violett oder Rot über. Die Probe ist außerordentlich empfindlich (1 : 1,000.000).

4. Reaktion von *Ehrlich.*[4]) Man extrahiert das Bilirubin der gefärbten Lösung oder den künstlich erzeugten Kalkniederschlägen mit Chloroform. Zu 1 Teil dieser Lösung setzt man 2 Teile einer 1‰igen Diazobenzolsulfosäurelösung (durch Auflösen von 1 *g* p-Anilinsulfosäure in 1 *l* Wasser, 15 cm^3 konzentrierter Salzsäure und 0·1 *g* Natriumnitrit) und fügt

---

[1]) *O. Hammarsten,* Eine neue Reaktion auf Gallenfarbstoffe, insbesondere im Harn. *Malys* Jahresb. 1898. S. 310. Upsala Läkareför. Förhandl. (N. F.). p. 4.

[2]) *H. Huppert,* Archiv für Heilkunde. Bd. 8. S. 351 u. 467 (1867); vgl. *I. Munk,* Über den Nachweis des Gallenfarbstoffes im Harn. Arch. f. Anat. u. Phys. (Phys. Abt.) S. 361 (1898).

[3]) *M. Nakayama,* Über eine Modifikation der *Huppert*schen Gallenfarbstoffreaktion. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 36. S. 398 (1902).

[4]) *P. Ehrlich,* Sulfodiazobenzol, ein Reagens auf Bilirubin. Zentralbl. f. klin. Med. Bd. 4. S. 721 (1883); vgl. hierzu Wiener klin. Wochenschr. Bd. 8. S. 173 (1898).

soviel Alkohol hinzu, daß eine homogene Mischung entsteht. Es entsteht aus der gelben eine rote Färbung, die in tiefes Blau übergeht.

Zum Nachweis der Gallenfarbstoffe **im Harn** haben die genannten Oxydationsproben einige Modifikationen erfahren.

Für *Gmelins* Reaktion. Man tränkt Filtrierpapier mit gallenfarbstoffhaltigem Harn und läßt auf das ausgebreitete Papier einige Tropfen Salpetersäure fallen. Im Umkreis jedes Tropfens entstehen konzentrische Ringe, von innen nach außen gelbrot, rot, violett, blau, grün (*Rosenbach*).[1]

*Rosin*sche Probe.[2] Man verwendet als Oxydans des angesäuerten ikterischen Harns eine 1%ige alkoholische Jodtinktur. An der Grenze der überschichteten Flüssigkeiten entsteht ein grüner, lange haltbarer Farbring.

Für *Hupperts* Reaktion: Die bereits erwähnte Modifikation von *Nakayama* (siehe S. 732, Note 3), besonders für indikanreiche dunkle Harne verwertbar.

Für *Hammarstens* Probe[3]): Man fällt in 10 *cm*³ ikterischen Harns die Farbstoffe mit einigen Kubikzentimetern $BaCl_2$- oder $CaCl_2$-Lösung, mischt gut durch und zentrifugiert. Die trübe, überstehende Flüssigkeit wird abgegossen. Dann werden 1—2 *cm*³ des Säurereagens (siehe oben) zugefügt, stark durchgeschüttelt. Nach abermaligem Zentrifugieren ist die überstehende Flüssigkeit grün. Bei Anwesenheit von wenig Gallenfarbstoff verwendet man ein Säuregemisch von 1:99 statt 1:19 (Salpetersäure: Salzsäure).

4. Qualitative Spezialreaktionen und Eigenschaften der einzelnen Gallenfarbstoffe.

Für Bilirubin: 1. Die wässerige Bilirubinlösung ist noch in größter Verdünnung (1:500.000) gelb, sie zeigt keine Absorptionsstreifen, sondern eine kontinuierlich vom roten zum violetten Ende fortschreitende Verdunklung.

Eine alkalische Bilirubinlösung in Wasser färbt sich nach Zusatz von überschüssigem Ammoniak und Chlorzink erst tief orange, alsbald olivenbraun, zuletzt grün. Im Spektrum dieser Lösung treten die Streifen des alkalischen Cholecyanins im Rot zwischen C und D, nahe bei C auf.

Aus einer wasserfreien Chloroformlösung von Bilirubin fällt Brom in Chloroform gelöst ein schwarzblaues Pulver eines Tribrombilirubins, das in Alkalien dunkelblau löslich ist.

---

[1]) *O. Rosenbach*, Zur Untersuchung des Harns auf Gallenfarbstoff. Centralbl. f. d. med. Wissensch. Nr. 5 (1876).

[2]) *H. Rosin*, Eine empfindliche Probe für den Nachweis von Gallenfarbstoff im Harn. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 30. S. 106 (1893).

[3]) *O. Hammarsten*, Centralbl. f. med. Wissensch. Nr. 55 (1876); vgl. *Hoppe-Seyler, Thierfelder*, Chemische Analyse. S. 456 (1903); vgl. auch Skand. Arch. f. Phys. Bd. 9. S. 313 (1899).

Mit Diazoverbindungen kondensiert sich Bilirubin zu schönen Farbstoffen (*Ehrlich* [siehe S. 732, Note 4], *Pröscher*[1]), *Orndorff* und *Teeple*[2]).

Nachweis nach *Ehrlich*.[3]) Man versetzt eine Lösung von Bilirubin in Chloroform (bzw. einen Alkoholauszug eines mit Ammonsulfat gesättigten ikterischen Harns) mit dem doppelten Volumen einer Sulfodiazobenzollösung (dargestellt aus 1 *g* p-Anilinsulfosäure (-Sulfanilsäure) in 1000 cm^3 Wasser + 9·1 *g* $NaNO_2$) und soviel Alkohol, daß eine homogene Mischung entsteht.

Die bei dieser Mischung aus Gelb in Rot umgeschlagene Färbung geht durch tropfenweisen Zusatz von konzentrierter Salzsäure über Violett in ein intensives Blau über. Der Farbstoff kann mit Chloroform extrahiert werden oder bei Anstellung der Probe mit Harn durch Sättigen mit Kochsalz ausgesalzen werden. Auf Alkalizusatz entsteht durch Rot eine Grünfärbung. Der Umschlag läßt sich durch Überschichtung mit Kalilauge schön verfolgen.

Der Nachweis von *Pröscher* durch Kuppelung mit Diazoacetophenon bietet vor der Probe nach *Ehrlich* kaum Vorzüge.

Bilirubin färbt sich an der Luft oder beim Erwärmen grün.

2. Für Biliverdin. Dasselbe ist unlöslich in Chloroform (Gegensatz zu Bilirubin), aber leicht löslich mit blaugrüner Farbe in Alkohol (desgleichen Gegensatz zu Bilirubin). Die alkoholische Lösung wird mit Säure smaragdgrün (vgl. *Hammarsten*- und *Huppert*-Probe). Auch die Alkalisalze des Bilirubins sind grün.

3. Für Choleprasin. Es scheint die Löslichkeit mit grüner Farbe in Eisessig und der Schwefelgehalt charakteristisch.

4. Für Bilifuscin. Gut löslich in Eisessig, unlöslich in Wasser. Die Lösungen der Alkalisalze sind tiefbraun. Die *Gmelin*sche Gallenfarbstoffreaktion und die sonstigen Proben versagen, nur die alkalischen wässerigen Lösungen zeigen einen Absorptionsstreifen zwischen C und D.

5. Für Biliprasin. Ist wie Biliverdin mit grüner Farbe in Alkohol löslich. Die Lösung wird aber durch Ammoniakzusatz braun, durch nachfolgendes Ansäuern wieder grün. Nur die Lösung der Alkalisalze zeigt einen Absorptionsstreifen zwischen C und D.

6. Für Bilipurpurin. Die Lösungen in Chloroform sind dichroitisch. Mit konzentrierter Schwefelsäure entsteht eine grüne, mit verdünntem Alkali eine blaugrüne Farbe.

Es zeigt 3 Absorptionsstreifen, einen im Gelb, zwei im Grün.

---

[1]) *F. Pröscher*, Über Azetophenonazobilirubin. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **29**. S. 411 (1900).

[2]) *W. R. Orndorff* und *J. E. Teeple*, Über Bilirubin, den roten Farbstoff der Galle. *Salkowski*-Festschrift. Berlin 1904. S. 289.

[3]) *F. Pröscher*, Über den Nachweis von Bilirubin im Harn mittelst der *Ehrlich*schen Diazoreaktion. Centralbl. f. inn. Med. Nr. 22. S. 169 (1901).

5. Quantitative Bestimmung der Gallenfarbstoffe im Harn.

Eine exakte Methode der Bestimmung existiert bis heute nicht. Die hierzu angegebenen Wege von *Jolles*[1]) zur Bestimmung von Bilirubin und die klinische kolorimetrische Bestimmung nach *Bouma*[2]) führen nur zu Annäherungswerten. Wir übergehen daher ihre Besprechung.

Umwandlungsprodukte des Bilirubins.

Oxydation. Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß das für die *Gmelin*sche Probe charakteristische Farbenspiel durch das Entstehen von Oxydationsprodukten des Bilirubins bedingt ist. Das erste Oxydationsprodukt stellt das grüne Biliverdin dar, das vielleicht schon unter physiologischen Bedingungen sein Vorkommen nur der leichten Oxydierbarkeit des Bilirubins verdankt. In welcher Beziehung aber das grüne Choleprasin und das gleichfalls grüne Bilipräsin, beide in der natürlichen Galle bzw. deren Konkrementen enthalten, zu dem Biliverdin stehen, ist nicht aufgeklärt. Durch weiter fortschreitende Oxydation von Bilirubin oder Biliverdin entsteht ein blauer Farbstoff, das Cholecyanin bzw. Bilicyanin, schließlich bildet sich über den Weg eines noch nicht studierten roten Farbstoffes das gelbbraune Choletelin *(Maly)*. Das als Bilixanthin bezeichnete Oxydationsprodukt ist vielleicht auch in diese Reihe einzufügen.

Die Einheitlichkeit der hier angeführten Substanzen und ihre chemische Individualität ist durch die chemische Analyse wenig begründet. Eine Beurteilung der Analysenzahlen oder der Eigenschaften dieser Körper fällt um so schwerer, als sie gewiß nicht immer aus einem einheitlichen Bilirubin dargestellt sind. Charakteristisch und die spezifische Verschiedenheit dieser Körper beweisend aber ist das Verhalten ihrer spektralanalytisch festgestellten Absorptionsstreifen.

Einige kurze Daten über die Darstellungsmethoden dieser Gallenfarbstoffderivate seien hier mitgeteilt.

Darstellungsmethoden.

Biliverdin. Man überläßt eine alkalische Bilirubinlösung in dünner Schicht am Boden einer Schale ausgebreitet der Autoxydation an der Luft. Die allmählich braungrün gewordene Lösung wird mit verdünnter Salzsäure gefällt. Das ausfallende, amorphe Produkt wird auf einem Filter oder durch Dekantieren chlorfrei gewaschen und zur Reinigung mehrfach mit Wasser aus seiner alkoholischen Lösung ausgefällt. Zur Trennung von nicht umgewandelten Bilirubin extrahiert man den gewonnenen Körper ausgiebig mit heißem Chloroform.

---

[1]) *A. Jolles,* Beiträge zur qualitativen und quantitativen Gallenfarbstoffbestimmung im Harn. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **27**. S. 83 (1899).

[2]) *J. Bouma,* Über eine klinische Methode zur quantitativen Bestimmung der Gallenfarbstoffe im Harn. Deutsch. med. Wochenschr. Bd. **30**. S. 884 (1904).

Statt der Autoxydation kann man schneller nach *Hugounenq* und *Doyon*[1]) mit Natriumperoxyd in schwach salzsaurer Lösung oxydieren.

Man mischt zu diesem Zweck das trockene Bilirubin mit nicht zu viel Natriumperoxyd, gibt hierzu tropfenweise Wasser und dann verdünnte Salzsäure bis zur Sättigung und dann bis zu dem Auftreten einer grünen Farbe. Alsdann filtriert man schnell und wäscht mit Wasser bis zum Verschwinden der Säurereaktion. Den Pigmentrückstand kristallisiert man aus absolutem Alkohol um. Genaues zur Methodik siehe S. 642.

Auf eine Besprechung der als Cholecyanin und Choletelin[2, 3, 4]) bezeichneten Oxydationsprodukte kann hier verzichtet werden. Die sehr veralteten Angaben über diese Substanzen bedürfen einer dringenden Revision, nachdem jetzt erst absolut einheitliches Ausgangsmaterial von Bilirubin vorliegt.

IV. Farbstoffe im Harn von unbekannter Zusammensetzung.

Im normalen und pathologischen Harn kommen mehrere Farbstoffe vor. Bekannt, isoliert und eingehender studiert sind: das Urochrom, das Urorosein, das Uroroerythrin und schließlich das Urobilin.

Keiner dieser Farbstoffe ist bis jetzt in sicher analysenreinem Zustand isoliert, von keinem ist die Konstitution oder chemische Gruppenzugehörigkeit aufgeklärt. Außer einigen Versuchen, das Urobilin als ein Derivat der Gallenfarbstoffe zu erklären, herrscht noch vollständige Unsicherheit über die physiologische Genese dieser Substanzen.

Die Darstellung dieser Farbstoffe erfolgt mit Hilfe geeigneter Extraktionsmittel aus dem Harn bzw. der eingeengten Harnflüssigkeit, oder durch Extraktion von künstlich erzeugten, den Farbstoff adsorbierenden Salzfällungen.

Die Identifikation und der qualitative Nachweis geschieht durch charakteristische Farbenreaktionen, Farbeneigenschaften und Farbumwandlungen der Salze und Spektralerscheinungen der Farbstofflösungen in organischen Solventien. Da die verschiedenen Methoden der Isolierung keineswegs zu konstant zusammengesetzten Körpern führen, da andrerseits auch nur die Elementarzusammensetzung bis jetzt ein Kriterium der Reinheit und Einheitlichkeit der fraglichen Substanzen darstellt, so müssen wir in diesem Zusammenhang eine Mehrzahl von Darstellungsmethoden mitteilen.

1. Urochrom ist der Farbstoff des normalen und pathologischen Harns. Normale Menge etwa 0·15%.

---

[1]) *L. Hugounenq* und *M. Doyon*, Über ein neues Verfahren zur Darstellung von Bilirubin. Compt. rend. soc. biol. T. **48**. p. 430 (1896); Arch. de phys. (5.) T. **8**.

[2]) *A. Heynsius* und *F. Campbell*, Die Oxydationsprodukte der Gallenfarbstoffe und ihre Absorptionsstreifen. *Pflügers* Arch., Bd. **4**. S. 497 (1872). — *A. Heynsius*, Über Cholecyan und Choletelin. *Pflügers* Arch. Bd. **10**. S. 246.

[3]) *B. J. Stokvis*, Zentralbl. med. Wissensch. S. 785 (1872); Bd. **211**. S. 449 (1873).

[4]) *M. Jaffé*, Beitrag zur Kenntnis der Gallen- und Harnfarbstoffe. Ibid. (1868).

Darstellungsmethode nach *Garrod.*[1]) Größere Harnmengen werden in Portionen von ca. je 1 *l* mäßig erwärmt und mit fein gepulvertem festem Ammonsulfat gesättigt. Zu der klar filtrierten Flüssigkeit setzt man 1/5 ihres Volums absoluten Alkohol. Hierbei scheidet sich eine alkoholisch wässerige Schicht ab, welche den Farbstoff enthält. Diese wird in viel kaltes Wasser eingegossen. Die entstehende Lösung wird abermals mit Ammonsulfat gesättigt. Es scheidet sich wiederum eine alkoholische Farbstofflösung ab, die man durch Aufgießen auf festes Ammonsulfat in einem Standgefäß bei gelinder Wärme entwässert. Die überstehende alkoholische Lösung wird hierauf abgetrennt und bei alkalischer Reaktion unter häufigem Zusatz von Ammoniak auf dem Wasserbad eingetrocknet. Der braune Abdampfrückstand, der noch Ammonsulfat und Indoxylschwefelsäure enthält, wird 1—2mal mit Essigäther gewaschen (Indikanbeseitigung) und dann längere Zeit unter absolutem Alkohol belassen. Die schön gelb gefärbte Alkohollösung wird bis zur Orangefärbung eingeengt und mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Der flockig abgeschiedene Farbstoff wird auf dem Filter mit Äther gewaschen, getrocknet und nochmals mit Chloroform und Äther extrahiert. Das Urochrom hinterbleibt als eine amorphe braune Substanz.

Methode nach *Thudichum.*[2])

Man fällt aus dem Harn durch Zusatz von Ätzbaryt und Baryumacetat die Salze und die etwa beigemengten Blutfarbstoffe. In dem Filtrat fällt man nach 24 Stunden das Urochrom und Indoxyl mit Bleiacetat und Ammoniak.

Den entstehenden Bleiniederschlag wäscht man auf dem Filter gut aus und zerreibt ihn mit verdünnter Schwefelsäure. Das Filtrat des Baryum- und Bleisulfates wird mit Baryumkarbonat von überschüssiger Schwefelsäure befreit, abermals filtriert und mit Kohlensäure von Baryt befreit. Das gefärbte Filtrat wird nun mit festem essigsaurem Quecksilberoxyd versetzt. Der entstehende Niederschlag wird auf dem Filter mit heißem Wasser gewaschen. Die gelb gefärbte Quecksilberfällung wird, in Wasser fein verteilt, mit H_2S von Quecksilber befreit. Die gelbe, durch einen Luftstrom von H_2S befreite Lösung, welche noch Spuren von Essigsäure und Salzen enthält, wird mit frisch gefälltem Silberoxyd geschüttelt und filtriert. Das Filtrat wird mit H_2S von Silber befreit und eingedunstet. Es hinterbleibt ein Urochrom in Form einer festen, gelben Substanz zurück, das anscheinend von der Substanz von *Garrod* verschieden ist.

Methode von *Schunck.*[3]) Man fällt den Harn maximal mit Bleizucker, das gefärbte Filtrat wird mit Bleiessig gefällt und auf dem Filter gut gewaschen. Hierauf zerlegt man den Niederschlag unter Wasser mit Schwefel-

---

[1]) *A. E. Garrod,* Beitrag zum Studium des gelben Farbstoffs des Urins. Proc. of the Roy. Soc. Vol. **55**. p. 394 (1894).

[2]) *J. L. W. Thudichum,* Chemische Studien über den Harnfarbstoff. Brit. med. Journ. p. 509 (1864); Journ. f. prakt. Chemie. Bd. **104**. S. 257 (1868).

[3]) *Schunck,* vgl. *Huppert-Neubauer,* Analyse des Harns. 10. Aufl. S. 509. — Original: Proc. roy. soc. Vol. **16**. p. 85 (1867).

wasserstoff und dampft das gefärbte Filtrat des Schwefelbleis zur Trockene. Der Abdampfrückstand wird mit absolutem Alkohol extrahiert und nach der Methode von *Garrod* mit Äther gefällt. Auch dieses ätherunlösliche Urochrom ist von der *Garrod*schen Substanz verschieden. Ein Teil bleibt ätherlöslich.

Methode nach *Bondzynski*, *Dombrowski* und *Panek.*[1])

Bei der Darstellung der Alloxyproteinsäure wird ein Urochrom gewonnen. Als Ausgangsmaterial dienen die Gemenge von Calciumsalzen der Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe. Die chlorfreien Salze werden in Wasser und Essigsäure zu neutraler Reaktion gelöst und mit einer Kupferacetatlösung versetzt. Der entstehende reichliche Niederschlag wird nach einiger Zeit auf dem Filter gesammelt, mit Schwefelwasserstoff alsdann in der Wärme bei 45° zerlegt. Es entstehen braunrot gefärbte Lösungen des Urochroms. Die Identität dieses Körpers mit dem klassischen Urochrom steht noch nicht fest.

Darstellung nach *Dombrowski*[2]) als Silbersalz.

Aus dem Harn werden Schwefelsäure, Phosphorsäure und Harnsäure zunächst mit ammoniakalischem Baryum- und Calciumacetat gefällt. Auf 10 *l* Harn 86 *g* Ca-Acetat + 53 *g* Ba-Acetat + 43 *cm*³ 21% NH_3. Die Flüssigkeit wird mit Essigsäure neutralisiert und filtriert, aus dem schwach angesäuerten Filtrat wird das Urochrom mit Kupferacetat gefällt. Der graugrüne Niederschlag wird nach 24 Stunden auf dem Saugfilter gesammelt, gut gewaschen und in Wasser fein verteilt mit H_2S entkupfert. Nach Entfernung des H_2S-Überschusses durch Vakuumdestillation in einer CO_2-Atmosphäre bei gelindem Erwärmen wird die gelblichrote Flüssigkeit mit einem geringen Überschuß von Baryt gefällt. Das Filtrat des geringen gelben Niederschlags wird durch CO_2 von Baryum befreit, im Vakuum zum Sirup eingedickt und mit starkem Alkohol ausgefällt. Die Fällung wird alsdann in Wasser gelöst durch Zusatz von Natriumsulfat (ohne Überschuß) in das Natriumsalz verwandelt: die Lösung dieses Salzes wird im Vakuum eingeengt und durch Zusatz von Silbernitrat von Chlor befreit. Aus dem Filtrat des Chlorsilbers wird das Silbersalz des Urochroms durch Zusatz von Alkohol und einen Überschuß von konz. Silbernitratlösung gefällt. Das Salz wird zur Entfernung von Nitrat in Wasser gelöst und mit starkem Alkohol gefällt.

Methode von *Hohlweg.*[3]) Die Methode hat den Vorzug, den Farbstoff ohne Einwirkung chemischer Agentien durch Adsorption anzureichern.

---

[1]) *A. Bondzynski, H. Dombrowski* und *K. Panek*, Über die Gruppe von im normalen Menschenharn enthaltenen Säuren. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **46**. S. 83 (115). 1905.

[2]) *St. Dombrowski*, Über die chemische Natur des spezifischen Farbstoffes des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **54**. S. 188 (1907); vgl. auch *H. Liebermann*, Über die Gruppe schwefel- und stickstoffhaltiger Säuren im normalen Menschenharn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **52**. S. 129 (1907).

[3]) *H. Hohlweg*, Zur Kenntnis des Urochroms. Biochem. Zeitschr. Bd. **13**. S. 198 (1908). — Vgl. ibidem, Bd. 13. S. 205. 208 (1908).

sie führt jedoch bis jetzt nur zu einem Rohurochrom, das aber einer weiteren Verarbeitung für etwaige Konstitutionsnachweise sehr zugänglich ist.

Der eingeengte Harn oder das saure Filtrat des vorher bei ammoniakalischer Lösung mit Baryum- und Calciumacetat ausgefällten und von Baryt mit CO_2 befreiten Harns filtriert in langsamem Strom durch eine Schicht von Tierkohle, die sich in 5 *cm* breiten, 5 *cm* langen Glasröhren befindet. Wenn die Tierkohle mit adsorbiertem Farbstoff gesättigt ist, was an den farbig abtropfenden Filtraten erkenntlich ist, wird sie herausgenommen, getrocknet und in neuen Rohren mit Eisessig extrahiert. Das strohgelbe bis braunrote Extrakt wird im Vakuum bei 40° eingeengt und zu nahezu vollständiger Entfernung des Eisessigs zum Sirup eingedickt. Der Sirup wird dann mit wenig Wasser dickflüssig angerührt und mit dem 10fachen Volumen Äther gefällt. Es bildet sich bei Verwendung größerer Massen eine harzige Masse — der überstehende Äther ist meist ungefärbt —, die nach 12 Stunden erstarrt und bei 40° getrocknet wird.

Aus 25 *l* unverdünnten Harns werden etwa 3·1 *g* trockene Substanz dieses Rohurochroms gewonnen.

Zur Darstellung von Derivaten, Salzen oder Bromsubstitutionsprodukten ist eine wässerige Lösung des sirupösen Rückstandes der Eisessigextrakte direkt verwertbar.

Eigenschaften des Urochroms. Die nach verschiedenen Methoden dargestellten Farbstoffe zeigen keine übereinstimmenden Eigenschaften. Das Präparat nach *Garrod* und *Hohlweg* ist unlöslich in Alkohol, Amylalkohol, Aceton, Benzol, Chloroform, Ligroin, Äther und Essigäther.

Mischungen von Äther oder Chloroform mit Alkohol lösen.

Fällungsmittel sind: Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure.

Die wässerige Lösung zeigt keine Absorptionsstreifen.

Als einigermaßen bezeichnende Probe gilt das Auftreten einer starken, grünlichen Fluoreszenz nach Versetzen einer Urochromlösung mit reinem Acetaldehyd, kurzem Erwärmen und nachfolgendem Chlorzinkammoniak. Die Fluoreszenz wird nach 48 Stunden besonders deutlich.

Ein für Harnurobilin (s. dort) charakteristischer Absorptionsstreifen im Blau entsteht hierbei nicht.

Die Derivate verschiedener Urochrome, wie das Uromelanin, Uropittin *(Thudichum)* oder das Urianin bzw. Urian *(Schunck)* sind so wenig eingehend untersucht, daß auf ihre Besprechung verzichtet werden darf.

Für ein Urochromkupfer ergab sich die Elementarzusammensetzung:

C 36·76 H 3·56 N 9·72 S 2·57 Cu 20·10 p. c (*Dombrowski* etc.);

für ein Ca-Salz:

C 40·39 H 4·85 N 9·02 Asche 4·86 Ca 6·88 *(Salomonson)*;

für das freie Urochrom aus einem Silbersalz:

C 43·1 H 5·1 N 11·1 S 5·1 O 35·5%.

Quantitative Urochrombestimmung.

1. Eine von *Klemperer*[1]) ausgearbeitete kolorimetrische Methode zur annähernden quantitativen Urochrombestimmung hat mehr klinisches Interesse.

2. Der mit Barythydrat und Baryumacetat vorbehandelte Harn wird in abgemessener Portion mit Kupferacetat gefällt, der Niederschlag in einer bekannten Menge Ammoniak gelöst. Nun fällt man die Purinkörper mit ammoniakalischer Silberlösung. Der Stickstoffgehalt der gut mit Wasser gewaschenen Kupferfraktion und der aus der entsprechend großen Harnmenge gewonnenen Silberfraktion wird bestimmt. Die Differenz beider Werte gibt den Urochromstickstoff (vgl. *Dombrowski*).[2])

2. Uroerythrin (Purpurin, rosige Säure) ist der rote Farbstoff, der durch Adsorption an dem sogenannten Sedimentum lateritium, d. h. den spontanen Uratniederschlägen des Harnes haftet. Er wird aus diesem Uratsediment isoliert.

Er findet sich im normalen Harn, wird aber anscheinend durch allerlei Krankheiten, besonders solchen, welche eine Stauung des Leberkreislaufes herbeiführen, vermehrt. Genaue und sichere klinische Daten zu dieser Frage liegen nicht vor.

Methode der Isolierung nach *Garrod*.[3])

Das gesammelte Uratsediment wird unter gelindem Erwärmen in wenig Wasser gelöst. Durch Sättigen mit festem Ammoniumchlorid werden die gefärbten Urate wieder gefällt. Man filtriert ab und entfernt durch tüchtiges Waschen mit einer gesättigten Ammoniumchloridlösung andere etwa anhaftende Harnfarbstoffe (Urobilin!). Den Niederschlag digeriert man dann im Dunkeln einige Stunden lang mit heißem, absolutem Alkohol, filtriert dann ab und verdünnt mit dem doppelten Volumen Wasser. Die entstehende Lösung wird zur Sicherheit mit Chloroform ausgeschüttelt (Entfernung von Hämatoporphyrin), dann mit Essigsäure schwach angesäuert und abermals mit Chloroform erschöpft. Die jetzt uroerythrinhaltige Chloroformlösung wird mit Wasser säurefrei gewaschen und bei niedriger Temperatur im Dunkeln verdunstet.

Qualitativer Nachweis. Uroerythrin ist aus genuinem Harn mit Amylalkohol auszuschütteln. (Vorsicht vor Verwechslungen mit Urorosein.) Die Lösung wird durch konzentrierte Schwefelsäure karminrot, durck starke, fixe Alkalien über purpur und blau schnell grün gefärbt. Lösung wie Lösungsrückstand verblassen leicht im Licht.

---

[1]) *G. Klemperer*, Die Messung des Harnfarbstoffes. Berliner klin. Wochenschr. S. 313 (1903).

[2]) *St. Dombrowski*, Die Ausscheidung des Urochroms im Harn von gesunden Menschen, sowie in einigen Krankheitsfällen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 54. S. 390 (1907).

[3]) *A. E. Garrod*, A contribution to the study of uroerythrin. Journ. of physiol Vol. 17. p. 439 (1895).

Mit Chlorzinkammoniak entsteht keine Fluoreszenz (Gegensatz zu Urochrom bzw. Urobilin). Geeignete Lösungsmittel sind: Essigäther, Chloroform, Alkohol, Wasser.

Spektralprobe. In verdünnter alkoholischer Lösung eine breite Lichtabsorption, die in der Mitte zwischen D und E beginnt, genau bis F reicht und zwischen E b eine kleine, schwache Aufhellung zeigt (das nach violett gelegene Band ist etwas dunkler). Konzentrierte Lösungen zeigen einen zusammenhängenden, kontinuierlichen Schatten, der bei $\lambda = 552$ beginnt.

3. Urorosein[1]) ist ein roter Farbstoff des Harns, der aus einem farblosen Chromogen durch Behandeln des Harns mit starker Salzsäure oder gleichzeitigem Zusatz einer Spur Chlorwasser oder Chlorkalk oder Nitrit als Oxydans entsteht; seine Menge ist bei Kranken vermehrt, sein Chromogen aber in jedem normalen Harn enthalten. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieser Farbstoff mit dem sogen. Skatolrot identisch ist. Nach den jüngsten Beobachtungen *Herters* ist der Körper mit der Indolessigsäure identisch (vgl. S. 755 bei Skatolrot).

Darstellung des Chromogens nach *Rosin.*[2]) Eine größere Harnmenge wird mit Bleizucker versetzt; die Fällung wird abfiltriert. Das Filtrat wird mit Ammoniak versetzt, die neue Fällung wird mit der ersten Fällung vereinigt und bei mittlerer Temperatur getrocknet. Die fein zerriebenen Pulver extrahiert man am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol. Die Extraktion wird so lange fortgesetzt, als noch eine Alkoholprobe nach Zusatz von Chlorkalk und von Salzsäure Rotfärbung zeigt. Aus den ungefärbten alkoholischen Lösungen entfernt man Spuren von Blei mit Schwefelwasserstoff. Die alkoholischen Filtrate werden hierauf konzentriert, mit Äther gefällt und dann durch Verdunsten vom Äther befreit. Die Rückstände werden dann gut mit Äther zur Befreiung von Phenolen erschöpft und hierauf wiederum in ganz wenig Alkohol gelöst. Zu dieser Lösung wird Äther bis zu eben beginnender Trübung zugesetzt. Beim Stehen scheiden sich farblose Nadelkristalle des Chromogens ab. Ein kristallisiertes Chromogen erhielt auch *Herter* als Rückstand der Chloroformextrakte der entbleiten, nach *Rosin* vorbereiteten, farblosen Flüssigkeiten.

Qualitativer Nachweis im Harn und Isolierung des Uroroseins. Man versetzt den Harn mit konzentrierter Salzsäure und Chlorkalk. Gewisse Harne geben je nach dem Reichtum an Chromogen und einem Gehalt an Nitraten die Rotfärbung schon nach Mineralsäurezusatz allein. In diesen Fällen wird die Oxydation durch Abspaltung von Nitriten durch die starke Säure oder durch bereits vorher bakteriell im Harn gebildete Nitrite vermittelt (*Herter*[3]). Das frei werdende Indigo wird durch Chloroform

[1]) *M. Nencki* und *N. Sieber*, Urorosein, ein neuer Harnfarbstoff. Journ. f. prakt. Chemie. **26**. 333 (1882).

[2]) *H. Rosin*, Ein Beitrag zur Lehre von den Harnfarbstoffen. Deutsche med. Wochenschr. S. 51 (1893); Zentralbl. f. klin. Med. S. 510 (1889).

[3]) *C. A. Herter*, Die Beziehung von nitrifizierenden Bakterien zur Uroroseinreaktion von *Nencki* und *Sieber*. Journ. of biol. Chem. Vol. **4**. p. 239 (1908).

entfernt. Der rosa gefärbte Harn gibt den Farbstoff beim Durchspülen an Amylalkohol. Die rot gefärbte Amylalkohollösung entfärbt sich unter Bildung ungefärbter Salze beim Durchschütteln mit Lauge; die klare Amylalkohollösung, welche jetzt den reinen Farbstoff ohne beigemengte Pigmente enthält, färbt sich beim Ansäuern wieder rot.

Von Indigrot kann man auch auf folgendem Weg trennen:

Der farbige, uroroseinhaltige Harn wird alkalisch gemacht und bei dieser Reaktion mit Äther ausgeschüttelt. Es geht das farblose Natronsalz des Uroroseins mit Indigrot in Lösung. Nun schüttelt man mit Säure aus. Es bleibt das Indigrot in ätherischer Lösung, während das freie Urorosein die Säure rosa färbt.

Spektralprüfung. Die Lösungen in Amylalkohol geben einen scharf begrenzten Absorptionsstreifen bei $\lambda = 557 \mu\mu$ im Grün zwischen D und E, und zwar näher an D. Diese Probe ist zur sicheren Identifikation unerläßlich.

4. Urobilin und Urobilinogen ist in jedem normalen, entleerten Harn enthalten. Seine Menge ist bei Fieberkranken, Ikterischen und Leberkranken sowie sonstigen pathologischen Prozessen vermehrt. Sicher aber ist der Farbstoff ein physiologisches Produkt: Urobilin entsteht aus einem farblosen Chromogen unter dem Einfluß des Sonnenlichtes.

Außer im Harn kommt es im Dünndarm, Dickdarm, in den Fäzes (nicht im Meconium) vor, wo es durch reduzierende Mikroorganismen aus Derivaten des Gallenfarbstoffes entsteht. Es ist ferner in der Kuhmilch, in menschlichen Plazenten und im Gewebssaft von Gastropoden enthalten.

Die Beziehung dieser Substanz zum Hydrobilirubin ist noch nicht sichergestellt.

Darstellung aus Harn. Methode nach *Garrod* und *Hopkins*.[1]) Man sättigt größere Harnmengen mit Salmiak und filtriert von der abgeschiedenen Harnsäure ab. Aus dem Filtrat wird das Urobilin durch Sättigen mit Ammonsulfat ausgefällt. Den entstandenen Niederschlag sammelt man auf einem Filter und trocknet. Aus dem trockenen Substanzgemenge wird das Urobilin mit viel Wasser extrahiert und aus seiner Lösung abermals durch Sättigen mit Ammonsulfat gefällt. Die Salzfällung wird hierauf im Scheidetrichter mit einer Mischung von 1 Teil Chloroform und 2 Teilen Äther durchgeschüttelt. Der Chloroformlösung wird der Farbstoff mit schwach ammoniakhaltigem Wasser entzogen und eventuell nochmals mit Am_2SO_4 gefällt und schließlich wieder in Chloroform aufgenommen. Der Chloroformrückstand wird schließlich in Alkohol gelöst. Der Rückstand der filtrierten Alkohollösung ist reines Urobilin.

Methode nach *Jaffé*.[2]) Der Harn, am besten Fieberharn, wird mit Bleiessig gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit Wasser gewaschen

[1]) *A. E. Garrod* und *F. G. Hopkins*, Über Urobilin. Journ. of physiol. Vol. **20**. p. 112 (1898) und Vol. 22. p. 451 (1898).

[2]) *M. Jaffé*, Zur Lehre von den Eigenschaften und der Abstammung der Harnpigmente. *Virchows* Archiv. Bd **47**. S. 405 (1869).

bei Zimmertemperatur getrocknet und mit Alkohol energisch ausgekocht. Der verbleibende Rückstand wird mit kaltem, schwefelsäurehaltigem Alkohol zerlegt und in Lösung gebracht. Die filtrierte Lösung wird kräftig mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Chlorzink ausgefällt. Der entstehende Niederschlag wird nun mit Wasser chlorfrei gewaschen, mit kochendem Alkohol erschöpft, bei Zimmertemperatur getrocknet, in Ammoniak gelöst und erneut mit Bleizucker gefällt. Der neu entstandene Niederschlag wird wiederum mit Wasser gewaschen, mit Alkohol ausgekocht und durch schwefelsäurehaltigen Alkohol zerlegt.

Die abfließende alkoholische Lösung wird mit dem halben Volumen Chloroform versetzt und mit Wasser vorsichtig, ohne starkes Schütteln, erschöpft. Die mit Wasser gewaschene Chloroformlösung wird abgetrennt. Der Destillationsrückstand ist Urobilin.

In urobilinreichen Harnen (qualitative Vorprobe!) kann man die erste Bleifällung unterlassen und sofort mit Chlorzinkammoniak ausfällen und, wie beschrieben, weiter behandeln.

Die Ausbeuten sind gering, die Reinheit des Farbstoffs aber eine große.

Methode von *Huppert* und *Müller.*[1]) Aus dem Harn fällt man zunächst Harnsäure und etwa vorhandene Blutfarbstoffe mit alkalischer Chlorbaryumlösung (1 Volumen gesättigter $BaCl_2$-Lösung auf 2 Volumen gesättigter Barytlösung, hiervon 30 Teile auf 100 Teile Harn). Aus dem Filtrat dieser Fällung beseitigt man den Baryt durch konz. Natriumsulfatlösung, dann neutralisiert man nahezu mit Schwefelsäure, filtriert und fällt erneut durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat. Eine eventuell auftretende saure Reaktion wird mit NH_3 abgestumpft. Die Fällung wird nach einigen Stunden auf Faltenfiltern gesammelt und mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, an der Luft ohne Erwärmen getrocknet und dann warm und noch feucht mit einer Lösung von 1 Teil Äther mit 2 Teilen Alkohol heiß extrahiert. Alsdann mischt man die Extrakte in der bereits beschriebenen Weise mit Chloroform und schüttelt im Scheidetrichter mit dem doppelten Volumen Wasser durch. Die abgetrennte Chloroformlösung wird noch mehrmals mit Wasser gewaschen. Schließlich entzieht man das Urobilin der Chloroformlösung durch Schütteln mit ammoniakhaltigem Wasser. Das Urobilin bleibt als Abdampfrückstand der Ammoniaklösung. Besser ist es, den Farbstoff mit Säure zu fällen, abermals in Chloroform aufzunehmen und als Chloroformrückstand bei gewöhnlicher Temperatur zu gewinnen.

Darstellung von Urobilinogen nach *Saillet.*[2]) Der eiweißfreie Harn (100 cm^3) wird im Dunkeln entleert, mit 10 Tropfen Eisessig versetzt und mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt. Den Essigäther

---

[1]) *H. Huppert,* Analyse des Harns. 10. Aufl. S. 527. — Vgl. hierzu *G. Hoppe-Seyler,* Über die Ausscheidung des Urobilins in Krankheiten. *Virchows* Archiv. Bd. **124**. S. 34 (1891).

[2]) *Saillet,* Über das Urobilin im normalen Harn. Revue de méd. T. **17**. p. 109 (1897).

verwendet man jeweils zur Extraktion neuer Harnportionen, indem man Verluste durch neuen Zusatz ergänzt. Durch Schütteln mit wenig Wasser entzieht man dem Essigäther etwa bereits vorhandenes Urobilin. Im Falle seiner Anwesenheit färbt sich das Wasser braun. Den Nachweis des Urobilinogens erbringt man nun, indem man die Essigätherlösung der Lichtwirkung aussetzt und das sich bildende Urobilin wiederum mit angesäuertem Wasser extrahiert und nach einer der folgenden Methoden qualitativ identifiziert.

Qualitativer Nachweis und Identifikation des Urobilins.

Von den äußeren Eigenschaften des Urobilins ist die Fluoreszenzerscheinung seiner alkalischen Lösung und das charakteristische Spektralbild der Absorptionsstreifen verwertbar. Letzteres allein gestattet die Identifikation des isolierten Farbstoffes.

I. Im Harn:

1. Man versetzt den Harn mit einigen Tropfen Schwefelsäure und prüft spektroskopisch (s. u.): stark dunkelgefärbte Harne verhindern bisweilen die spektroskopische Analyse. In diesem Falle beseitigt man die Farbstoffe (Gallenfarbstoffe) durch Zusatz von dem halben Volumen an *Deniges*' Reagenz (5 *g* HgO in 20 *cm*³ Schwefelsäure + 100 *cm*³ Wasser) und prüft das Filtrat der entstehenden Fällung.

2. Man versetzt den Harn mit Ammoniak, filtriert und setzt etwas (10⁰/₀) Chlorzinklösung zu. Das Auftreten einer rotgrünen Fluoreszenz zeigt Urobilin an. Die Probe wird durch spektroskopische Prüfung der fluoreszierenden Lösung kontrolliert.

Man kann auch nach *Schlesinger*[1]) derart verfahren, daß man zu dem Harn das gleiche Volumen einer 10⁰/₀igen, absolut alkoholischen Zinkacetatlösung zufügt und dann filtriert. Die leichteste Fluoreszenz läßt sich mit einer Konvexlinse beobachten.

3. Sind die Harne dunkel gefärbt oder urobilinarm, so extrahiert man das Urobilin, indem man etwa 50 *cm*³ Harn mit einigen Tropfen Salzsäure ansäuert und mit 25 *cm*³ Amylalkohol unter gelindem Durchmengen extrahiert.[2]) Die beiden Lösungen schickt man durch ein kleines Filter und prüft dann die abgetrennte amylalkoholische Schicht spektroskopisch und auf Fluoreszenz nach Zusatz einer alkoholischen Chlorzink- oder Zinkacetatammoniaklösung. 1 *g* Chlorzink in 100 *g* ammoniakhaltigem Alkohol.

Die Methoden der Extraktion sind mannigfaltig modifiziert worden:

Nach *Roman* und *Deluc*[3]): Man säuert 100 *cm*³ Harn mit 8 bis 10 Tropfen Salzsäure an und schüttelt vorsichtig mit 20 *cm*³ Chloroform aus. Von der durch ein Asbestfilter geschickten Chloroformlösung werden 2 *cm*³

[1]) *W. Schlesinger*, Zum klinischen Urobilinnachweis. Deutsche med. Wochenschr. S. 561 (1903).

[2]) *M. Nencki* und *A. Rotschy*, Zur Kenntnis des Hämatoporphyrins und des Bilirubins. Monatsh. f. Chemie. Bd. **10**. S. 568 (1889).

[3]) *Th. Roman* und *G. Deluc*, Nachweis von Urobilin im Harn. Journ. de Pharm. et Chim. (6. Serie). Vol. **12**. p. 49 (1900); ibidem Vol. **19**. S. 425.

mit dem doppelten Volumen einer 0·1%igen alkoholischen Zinkacetatlösung überschichtet. An der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten entsteht ein grüner Ring. Beim Umschütteln tritt grüne Fluoreszenz in der ganzen Mischung auf. (Grün im auffallenden, rot im durchfallenden Licht.)

Andere Methoden, die keine Vorzüge bieten, sind von *Grimbert* und *Jolles*[1]) angegeben.

Versagen auch diese Proben, so ist die Isolierung aus größeren Harnmengen nach einer der beschriebenen Methoden am Platz.

Spektroskopische Prüfung. Verdünnte Säurelösungen zeigen einen Absorptionsstreifen zwischen C und F, mehr an F und etwas über F hinausgehend. In alkalischer Lösung ist der Streifen weniger stark und mehr nach C gerückt, am schwächsten in ammoniakalischer Lösung. In Anwesenheit von Chlorzink aber ist der Streifen sehr deutlich.

Hat man einen bereits isolierten Farbstoff als Urobilin zu identifizieren, so ist das spektroskopische Verhalten besonders charakteristisch.

1. In saurer oder neutraler Lösung in Alkohol oder Chloroform: breiter Streifen zwischen E und F, der, bei starker Konzentration etwas über F hinausreichend, gleichmäßig in die Verdunklung im Violett übergeht.

2. Nach Alkalisieren verdünnter Lösungen: Verschwinden des genannten Streifens. Nach Zusatz von Chlorzink Auftreten eines einzigen breiten Streifens ziemlich in der Mitte zwischen E und F, näher dem Rot zu gelegen, ohne Verdunklung in Violett.

3. In konzentrierten Lösungen: Nach Ansäuern einer konzentrierten Urobilinlösung in schwacher Lauge mit Schwefelsäure zu eben beginnender Trübung entsteht ein neues Band an der Linie E neben dem Spektrum des sauren Urobilins (sub 1). Der Streifen ist mit γ durch einen Schatten verbunden.

Handelt es sich um die Isolierung oder den Nachweis von Urobilin in Fäzes oder anderen Gewebssäften, so ist eine Darstellung des Farbstoffs durch vorangehende Isolierung immer zweckmäßig.

II. Aus Fäzes. Man extrahiert die Fäzes durch Zerreiben mit schwefelhaltigem Alkohol, engt das Extrakt bei 40—50° ein und nimmt, wie bei der Isolierung nach *Huppert*, in Chloroform auf. Die spektroskopische Probe und Fluoreszenzprüfung entscheidet dann. Tritt keine Fluoreszenz auf, so überzeugt man sich, ob nicht nach Zusatz von 1 Tropfen Jodtinktur zu 10 cm^3 Alkoholextrakt Urobilinogen in Urobilin übergeht, *Steensma*.[2])

In anderen Fällen extrahiert man die Fäzes mit verdünnter Schwefelsäure (2 p. m.) und isoliert durch Fällung mit Ammonsulfat nach *Garrod* (s. o.).

Ohne Isolierung kann man Urobilin in Fäzes nach Angaben von *Schmidt*[3]) feststellen. In einem kleinen, weißen Porzellanschälchen verreibt

---

[1]) *L. Grimbert*, Aufsuchung von Urobilin im Urin. Compt. rend. de la soc. de biol. V. **56**. p. 599 (1904).

[2]) *F. A. Steensma*, Über die Untersuchung der Fäzes auf Urobilin. Nederl. Tijdschr. f. Geneesk. I. S. 273 (1907).

[3]) *A. Schmidt*, Über Hydrobilirubinbildung im Organismus unter normalen Verhältnissen. Verhandl. d. 13. Kongresses f. innere Med. S. 320 (1895).

man die Fäzesprobe mit gesättigter, wässeriger Sublimatlösung und läßt dann in einem Uhrschälchen 24 Stunden lang bedeckt stehen. Rote bis tiefrote Teile, die makroskopisch oder auch mikroskopisch erkenntlich sind, zeigen Urobilin, grüne Teile Bilirubin an.

Versuche quantitativer Urobilinbestimmungen im Harn:

a) Gravimetrisch nach *Hoppe-Seyler* (siehe S. 743, Note 1).

In einer abgemessenen Harnmenge wird das Urobilin nach *Garrod* bei schwefelsaurer Reaktion mit Ammoniumsulfat gefällt. Der nach geraumer Zeit abfiltrierte Niederschlag wird auf einem Filter gut mit gesättigter Am_2SO_4-Lösung gewaschen, oberflächlich getrocknet und in gleichen Teilen Alkohol und Chloroform aufgenommen. Im Scheidetrichter bringt man durch Wasserzusatz das Chloroform zur Abscheidung. Nach vollständiger Klärung derselben führt man dieselbe in ein gewogenes Becherglas über, läßt abdunsten und trocknet schließlich bei 100°. Hierauf extrahiert man abermals mit Äther und filtriert den Äther ab. Der Filterrückstand (das Urobilin) wird nun in Alkohol aufgenommen, in dem früheren Becherglas gesammelt. Nach Verdunsten und Trocknen wird das Urobilin gewogen.

b) Spektrophotometrische Bestimmung nach *Saillet* (siehe S. 743, Note 2).

In einer sauren Urobilinlösung mit einer Dicke der Flüssigkeitsschichte von 15 *mm* liegt die Grenze der Wahrnehmbarkeit des Absorptionsbandes bei einer Konzentration von 1 *mg* Urobilin in 22 cm^3 Lösung. Man verdünnt daher die fragliche, urobilinhaltige Lösung bis zu der Grenze der eben verschwindenden Wahrnehmbarkeit eines Absorptionsstreifens bei einer Flüssigkeitsdichte von 15 *mm* und berechnet aus dem vorhandenen Gesamtvolumen der Flüssigkeit die Urobilinmenge. Natürlich müssen zu dieser Bestimmung reine Urobilinlösungen verwandt werden. Zu diesem Zweck sammelt man den Harn bei Petroleumlicht, säuert ihn mit Essigsäure an und extrahiert das Urobilinogen mit Essigäther. In der abgetrennten Lösung wird durch Schütteln mit Salpetersäure das Chromogen zu Urobilin oxydiert. Durch Schütteln mit ammoniakalischem Wasser geht dieses quantitativ in die wässerige Lösung über. Nun säuert man abermals mit Salzsäure an und verdünnt mit Wasser bis zu der oben genannten Grenze unter Kontrolle im Spektroskop. Kennt man die Schichtdicke der untersuchten Lösung E und die Menge derselben V, so ergibt sich die Urobilinmenge aus der Formel: $x = \frac{V}{22\ cm^3} \times \frac{15\ mm}{E}$.

Qualitativer Nachweis des Urobilinogens.

Der nicht dem Licht ausgesetzte Harn wird angesäuert. Durch Extraktion mit Essigäther oder Chloroform, Ätheramylalkohol entstehen Lösungen, mit denen die Urobilinproben gelingen, wenn das Chromogen durch Oxydantien (Jod, Permanganat, Salpetersäure) in den Farbstoff

verwandelt ist. Beim Versetzen mit Paradimethylaminobenzaldehyd[1]) und nachträglichem Erhitzen entsteht eine Rotfärbung mit einem breiten Absorptionsstreifen zwischen D und E im Orange (*Neubauer*[1]), *Hildebrandt* u. a.[2])

Nachweis von Urobilinogen in Fäzes. Aus einer Probe von Fäzes werden Indol und Skatol durch Verreiben mit Ligroin entfernt. Der Rückstand wird mit Alkohol extrahiert. Mit der filtrierten Probe des Extrakts wird die Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd angestellt (die Probe ist aber nicht absolut eindeutig, da sie auch mit den durch Reduktion von Bilirubin, Hämatoporphyrin, Hämatin und Chlorophyll entstehenden Körpern — die allerdings vielleicht mit Urobilinogen identisch sind — positiv ausfällt).

V. Harnfarbstoffe der Indol- und Skatolgruppe und ihre Chromogene.

Das Tryptophan des Eiweiß erleidet im Darmkanal durch die Fäulnisbakterien eine tiefgreifende Veränderung. Als Endprodukte dieses Abbaus entstehen schließlich Indol und Skatol. Beide Körper werden resorbiert und im intermediären Stoffwechsel zu Indoxyl bzw. Skatoxyl oxydiert. Diese Oxydationsprodukte werden schließlich durch Paarung mit Schwefelsäure oder Glukuronsäure entgiftet und in dieser gepaarten Form im Harn aus dem Körper entfernt.

Diese gepaarten Indoxyl- oder Skatoxylsäuren sind nun die Chromogene für eine Anzahl blauer und roter Farbstoffe, die aus ihnen durch Spaltung und nachfolgende Oxydation des Indoxyl- bzw. Skatoxylpaarlings entstehen können. Bisweilen finden sich die Farbstoffe im Harn bereits vor, d. h. sie entstehen ohne äußere experimentelle Eingriffe durch abnorme, pathologische Zersetzungen der Harne, oder sie werden aus dem im Harn präexistierenden Chromogen durch äußere Mittel erst dargestellt.

Man kennt ein Indigblau (Indigotin) von der Formel

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\NH\end{matrix}\right\rangle C:C\left\langle\begin{matrix}CO\\NH\end{matrix}\right\rangle C_6H_4$$

und ein mit diesem isomeres Indigrot (Indirubin) von der Formel

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\NH\end{matrix}\right\rangle C:C\left\langle\begin{matrix}C(OH)\\C_6H_4\end{matrix}\right\rangle N,$$

die beide durch Oxydation des Indoxyls (Indikan) entstehen. Ein als Skatolrot bezeichneter roter Farbstoff ist hinsichtlich seiner Genese noch nicht ganz aufgeklärt. Er wurde von manchen Autoren als ein dem Indi-

---

[1]) *M. Neubauer*, Über die neue *Ehrlich*sche Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München. Juli 1903.

[2]) *W. Hildebrandt*, Studien über Urobilinurie und Ikterus. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 59. S. 351 (1905).

rubin analoges Derivat eines hypothetischen Skatoxyls aufgefaßt, von anderen als der Abkömmling eines spezifischen, andersartigen Chromogens aufgefaßt *(Maillard, Staal)* oder als mit dem Urorosein des Harns identisch erklärt *(Porcher, Hervieux-Grosser)*. *Herter* hält den Körper für Indolessigsäure.

Die Mengen, in denen diese drei Farbstoffe im Harn auftreten oder entstehen können, sind abhängig von der Menge ihrer Chromogene, die ihrerseits von dem Maß der Darmfäulnis, der Eiweißfäulnis und mithin von der Ernährungsweise oder der Tierspezies wesentlich beherrscht werden. Da es nun durch experimentelle Bedingungen gelingt, die präformierten Chromogene quantitativ in die Farbstoffe umzusetzen, so besitzen wir in der Darstellung dieser Farbstoffe ein Mittel, das Chromogen qualitativ und quantitativ zu bestimmen, den Farbstoff quantitativ zu isolieren und denselben, d. h. also auch sein Chromogen chemisch zu identifizieren.

1. Indoxyl.

1. Qualitativer Nachweis von Indoxyl durch Überführung in Indigblau (Indikanreaktionen).

Methode nach *Jaffé*.[1]) Man fügt zu einer Probe des Harns (etwa 10 *cm*³), der eventuell vorher von Eiweiß befreit ist, das gleiche Volumen konzentrierter Salzsäure, hierauf unterschichtet man mit 2—3 *cm*³ Chloroform. Das durch die Salzsäure in Freiheit gesetzte Indoxyl wird nun durch vorsichtiges Zufügen von 1—3—5 Tropfen einer kalt gesättigten Chlorkalklösung zu Indigblau oxydiert. Durch vorsichtiges aber häufiges Umdrehen des verschlossenen Reagenzglases wird der blaue Farbstoff von dem die Flüssigkeit passierenden Chloroform aufgenommen. Die Färbung des Chloroforms ist von der Menge des vorhandenen Indoxyls und von der Intensität seiner Oxydation abhängig.

An Stelle des Chlorkalks sind andere Oxydationsmittel empfohlen: z. B. 10%ige Natriumpersulfatlösung, Ammoniumpersulfat, 1%ige Kaliumchloratlösung, Wasserstoffsuperoxyd oder Eisenchlorid.

Die Wahl eines dieser Oxydantien steht natürlich frei. Wichtig ist nur, die Menge des Oxydans so zu wählen, daß die Zerstörung des bereits gebildeten Indigblaus oder seine Umwandlung in das Indirubin verhindert wird. Ein Überschuß vermag das Indigo sehr rasch in farbloses Isatin zu verwandeln. Mit Rücksicht darauf dürfte sich die Wahl eines gelinden Oxydans eher empfehlen, das in der Probe nach *Obermayer* mit Eisenchlorid seine Anwendung findet.

Methode nach *Obermayer*.[2]) Man fällt den Harn zuerst mit der Hälfte seines Volumens mit 10%iger Bleizuckerlösung, filtriert und schüttelt die Probe mit dem gleichen Volumen rauchender Salzsäure, welche

[1]) *M. Jaffé*, Nachweis und quantitative Bestimmung des Indikans. *Pflügers* Arch. Bd. 3. S. 448 (1870).

[2]) *F. Obermayer*, Modifikation der *Jaffé*schen Indikanprobe. Wiener klin. Wochenschrift 1890. S. 176.

2 p. m. Eisenchlorid enthält. Man wiederholt dann das Umschütteln nach Zusatz einiger Kubikzentimeter Chloroform.

Die Probe ist entschieden jener von *Jaffé* vorzuziehen, da man durch die Bleifällung von störenden Einflüssen anderer Farbstoffe befreit ist, und da eine Emulgierung der beiden Flüssigkeiten beim Umschwenken des Reaktionsgemisches weniger leicht erfolgt.

Immerhin ist man aber auch bei Anwendung besonders älterer Lösungen des Reagens nach *Obermayer* auch nicht vor Überoxydation sicher. Natürlich ist die Anwendung des Eisenchloridreagens bei Harnen mit Phosphatreichtum oder bei Vorhandensein von Acetessigsäure, Antipyrin, Salicylaten nicht am Platze *(Gnezda)*.

Methode von *Ehrlich*.[1]) Man erhitzt eine Harnprobe mit der gleichen Menge einer Lösung von 0·33 *g* Dimethylparaaminobenzaldehyd in 50 cm^3 Wasser + 50 cm^3 konzentrierter Salzsäure zum Sieden und alkalisiert die abgekühlte Lösung mit Kalilauge oder Ammoniak. Rotfärbung beweist Indikananwesenheit (Gallenfarbstoff und urobilinogenhaltige Harne sind zu dieser Probe nicht zu verwenden).

Bei allen qualitativen Proben darf nur mit Vorsicht aus der Intensität der Chloroformfärbung auf den Indikangehalt geschlossen werden. Einesteils können durch Bildung von Indigrot neben Indigblau (Indigrot, entstanden durch Kondensation des durch Überoxydation erzeugten Isatins mit Indoxyl) Mischfarben entstehen, zum anderen aber ist die Intensität der Färbung auch von dem spezifischen Gewichte des Harnes abhängig, indem sie unabhängig von dem wirklichen Indikangehalt mit dem Steigen des spezifischen Gewichtes des Harns an Intensität zu- bzw. abnimmt *(Serkowski)*.

Auch wird diese Beurteilung bisweilen dadurch erschwert, daß sich anstatt der Blaufärbung der Chloroformextrakte eine violette Mischfarbe einstellt; dieselbe ist die Folge einer Überoxydation und spontanen Bildung von Indigrot, oder von einer Isatinbildung und Kondensation desselben mit präformiertem Indoxyl zu Indigrot.

2. Quantitative Bestimmungen des Indoxyls bzw. Indigblaus (Indikan).

Methode nach *Wang*.[2]) Dieselbe beruht im Prinzip darauf, daß das gesamte Indoxyl nach *Obermayer* in Indigo, dieses dann in Indigblausulfonsäure umgewandelt wird, und die Menge der letzteren durch Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt wird.

Man überzeugt sich durch qualitative Vorproben über den Reichtum des Harns an Indikan und wählt je nachdem die Menge Ausgangs-

---

[1]) *P. Ehrlich*, Über die Dimethylaminobenzaldehydreaktion. Deutsche med. Wochenschrift 1901. Nr. 15. — *J. Gnedza*, Nachweis von Indoxyl in gewissen pathologischen Harnen. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. T. **136**. p. 1406 (1903); Chem.-Ztg. Bd. **27**. S. 676 (1903).

[2]) *E. Wang*, Über die quantitative Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **25**. S. 406 (1898); vgl. daselbst: Bd. **27**. S. 135 (1899); Bd. **28**. S. 576 (1899).

material (25—50 cm^3 Harn bei Indikanreichtum, 300 cm^3 normalen Harn). Die 300 cm^3 Harn werden dann portionenweise mit 25 bis 50 cm^3 einer 20%igen Bleiacetatlösung versetzt und filtriert, 250 cm^3 des Filtrates werden in einem Scheidetrichter mit 250 cm^3 von *Obermayers* Reagens (konzentrierter HCl mit 2 . p. m. Eisenchlorid) und 30 cm^3 Chloroform versetzt und jeweils 1 Minute geschüttelt. Hierauf läßt man die Chloroformschicht vorsichtig ab und wiederholt die Ausschüttelungen mit neu zugefügten Chloroformmengen, bis die Chloroformextrakte farblos bleiben. Im allgemeinen genügen drei Ausschüttelungen. Die in einem Kölbchen gesammelten Chloroformextrakte werden zur Reinigung und Befreiung von salzsauren und organischen Verunreinigungen (Urobilin, Kresole, Phenole, aromatische Säuren, Oxysäuren) 2—3mal mit reinem Wasser und dann mit Natronlauge (1 : 1000) geschüttelt (*Maillard*[1], *Gnezda*). Durch Waschen mit Wasser werden die letzten Spuren Alkali entfernt. Hierauf wird die Chloroformlösung durch etwas Asbest filtriert. Das Filtrat wird durch Destillation von Chloroform befreit, der Rückstand kurze Zeit auf dem Wasserbad getrocknet und dann noch warm mit 10 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nachdem sich durch vorsichtiges Schütteln und Erwärmen auf dem Wasserbad während 10 Minuten alles gelöst hat, verdünnt man vorsichtig mit einer größeren Wassermenge. Geht nicht der gesamte Chloroformrückstand in Lösung, so filtriert man die verdünnte Lösung quantitativ von braunen Flocken ab und wäscht das Filter gut mit heißem Wasser aus. Nunmehr titriert man die schön blaue durchsichtige Lösung mit einer Kaliumpermanganatlösung, die auf eine Oxalsäurelösung von bekanntem Gehalt eingestellt ist. Man verwendet am besten ein Gemisch von 5 cm^3 einer 3 p. m. $KMnO_4$-Lösung + 195 cm^3 Wasser, deren Titer vorher bestimmt ist. Die Titrierung ist beendet, wenn eine grünliche Färbung verschwunden oder Gelbfärbung bzw. Farblosigkeit eingetreten ist.

Durch Multiplikation des Oxalsäurewertes der Titerlösung mit 1·04 ergibt sich die gefundene Indigomenge.

Beispiel:

1 cm^3 $KMnO_4$-Lösung (etwa 3 p. m.)	= 0·00596 *g* Oxalsäure
1 „ „	= 0·0062 „ Indigo
1 „ der verdünnten $KMnO_4$-Lösung (5 : 195)	= 0·00015 *g* „

Es seien verbraucht 4·3 cm^3 $KMnO_4$-Lösung = 0·00065 „ „ von dem ursprünglichen Flüssigkeitsvolumen (300 Harn + 25 cm^3 Bleizuckerlösung) wurden verwendet 250 cm^3.

Also: 250 : 0·00065 = 325 : x.

x = 1·3 . 0·00065 = 0·000845 *g* Indigo in 300 cm^3 Harn.

---

[1]) *L. C. Maillard,* Über die Entstehung der Indoxylfarbstoffe und die Bedeutung des Harnindoxyls. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41. S. 437 (1904). — *E. Salkowski,* Indikanbestimmung. Ibid. Bd. 42. S. 213 (1904).

Methode nach *Bouma.*[1]) Sie beruht im Prinzip darauf, daß sich das durch Säurespaltung in Freiheit gesetzte Indoxyl mit Isatinsalzsäure zu dem einheitlichen Indigorot umsetzt, das nachher mit einer auf reines Indigrot eingestellten Kaliumpermanganatlösung titriert wird.

Auch hier überzeugt man sich durch kolorimetrische Vorproben von dem bestehenden Indoxylreichtum, indem man gleiche Mengen Harn und Isatinsalzsäurereagens (20 *mg* Isatinum Merck purissimum in 1000 cm^3 chemisch reinster, eisenfreier konzentrierter Salzsäure) kocht und mit etwas Chloroform ausschüttelt. Indikanreichtum veranlaßt eine dunkelweinrote, Indikanarmut eine helle rosarote Färbung des Chloroforms. Im ersteren Falle verarbeitet man 25—50 cm^3, im letzteren Falle 300 cm^3 Harn. Diese 300 cm^3 werden mit 30 cm^3 basischem Bleiacetat gefällt; von dem klaren Filtrat werden 275 cm^3 (= 250 cm^3 Harn) abgemessen und $^1/_4$ Stunde lang mit dem gleichen Volumen der Isatinsalzsäurelösung auf dem Wasserbad erhitzt. Die abgekühlte Flüssigkeit wird dann in der oben beschriebenen Weise (Methode von *Wang*) mit 3mal 30 cm^3 Chloroform erschöpft. Nach dem Absetzen gießt man die Chloroformlösung vorsichtig in ein Kölbchen, destilliert die Hauptmasse Chloroform am Wasserbad ab und trocknet 2 Stunden bei 110°. Aus dem Rückstand entfernt man das überschüssige Isatin und die Salzsäure durch mehrfaches Waschen mit heißem Wasser. Das Residuum trocknet man abermals, löst wie bei *Wang* (siehe oben) in Schwefelsäure, verdünnt und titriert mit Permanganatlösung.

Die Indigolösung sowie die Titrierflüssigkeiten müssen vollkommen klar sein. Die Verdünnung der Indigrotflüssigkeit soll die Verdünnung von 1 *g* Indigrotdisulfonsäure auf 20000 cm^3 Wasser nicht überschreiten. Erfolgt beim Titrieren eine Braunfärbung durch Abscheidung allerfeinsten Mangandioxyds, so ist der Säuregrad mit starker Schwefelsäure zu erhöhen.

Die Berechnung der gefundenen Indigomenge erfolgt in der Weise, daß man die Permanganatlösung vorher auf eine Lösung von reinem Indigorot einstellt. Diese Lösung bereitet man sich derart, daß man käufliches Indigorot in Chloroform löst, aus dem Verdampfungsrückstand das reine Indigrot in Äther aufnimmt, und den getrockneten Ätherrückstand (= gereinigtes Indigrot) in einer Menge von 5 oder 10 *mg* genau abwägt und in konzentrierter Schwefelsäure löst. Hierzu fügt man zu beliebiger Verdünnung Wasser und bestimmt durch Titration mit einer Permanganatlösung (siehe bei *Wang*) diejenige Menge Permanganat, welche 1 *mg* Indigrot entspricht. Bei der Umrechnung der im Hauptversuch der Indoxylbestimmung verbrauchten Permanganatmenge (ausgedrückt in Kubikzentimeter der verbrauchten, vorher eingestellten Lösung) ist die Hälfte von dem gefundenen Wert für die Menge präformierten Indoxyls in Rechnung zu setzen, da ja die Hälfte des Indigrotmoleküls von dem im Versuch zugeführten Isatin geliefert worden ist.

---

[1]) *J. Bouma,* Über Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **32**. S. 82 (1901). — Nachtrag zur Methode der Indikanbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 356 (1903).

Beide Methoden, die von *Wang* und *Bouma*, sind zu klinisch verwertbaren Bestimmungsmethoden ausgearbeitet worden, indem die aus dem Harn gewonnene blaue Chloroformlösung kolorimetrisch mit einer Testlösung von Indigotin in Chloroform (*H. Strauß*[1]), jene des Indigrots mit einer Standartlösung von Indigrot (*Bouma*[2]) verglichen wird. Die Bestimmung nach *Bouma*, die die Benutzung eines käuflichen Indikanurometers erfordert, scheint sehr exakte Resultate zu geben (*Verum*). Die Beschreibung der Methode mag mit Rücksicht auf die dem Apparat beigegebene Gebrauchsanweisung hier übergangen werden.

Methode von *Ellinger*.[3]) Im wesentlichen wird die Methode von *Wang* beibehalten. Man verwende sauer reagierenden bzw. mit Essigsäure schwach angesäuerten Harn, dessen spez. Gew. 1020 nicht überschreiten soll. Durch $^1/_{10}$ Volumen Liquor. plumbi subacetici wird eine abgemessene Harnmenge erst gefällt. Ein abgemessenes Filtratvolumen wird dann nach *Wangs* Vorbild mit frisch bereitetem Reagens von *Obermayer* und Chloroform behandelt. Der nach *Wang* gewonnene Trockenrückstand der Chloroformextrakte wird mit Wasser gut gewaschen und nach Lösen in 10 *cm*³ H_2SO_4 und Verdünnen mit 100 *cm*³ Wasser mit $KMnO_4$ titriert. Der Titer der Stammlösung des Permanganats (ca. 3 *g* auf 100 *cm*³ H_2O) wird auf reines Indigotin eingestellt.

3. Qualitativer Nachweis von Indoxyl durch Überführung in Indigorot (Indirubin, Urorubin, Indigpurpurin).

Auch das Indigorot ist im normalen Harn nicht präformiert. Bereits bei Besprechung des Indigblaus und seiner Darstellung durch Oxydation von Indoxyl ist die Tatsache erwähnt, daß neben Indigblau leicht Indigrot auftreten kann. In der Tat ist bewiesen, daß das dem Indigblau isomere Indigorot durch langsame Oxydation aus dem Chromogen, dem Indoxyl, entsteht (*Maillard*). Es besteht daher die Möglichkeit, das Chromogen auch durch Überführung in Indigorot nachzuweisen.

Man erreicht diese, für den qualitativen Indoxylnachweis allerdings wenig verwertbare Umwandlung durch Erwärmen des Harns zum Kochen mit oder ohne Salzsäure (*Rosin*).

Darstellung des Indigorots aus Harn (*Rosin*).[4]) Große Mengen indoxylreichen Harns werden zu Portionen von 5 *l* mit Bleiessig gefällt.

---

[1]) *H. Strauß*, Zur Methodik der quantitativen Indikanbestimmung. Deutsch. med. Wochenschr. Bd. **29**. S. 299 (1902).

[2]) *J. Bouma*, Über eine bisweilen vorkommende Abweichung bei der Bestimmung des Harnindikans als Indigorot mittelst Isatinsalzsäure. Deutsche med. Wochenschr. Bd. 28. S. 705 (1902). — *H. P. T. Verum*, Quantitative Indikanbestimmung mit dem *Meisling*schen Kolorimeter. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 459 (1905).

[3]) *A. Ellinger*, Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38. S. 192 (178) (1903).

[4]) *H. Rosin*, Über das Indigorot (Indirubin). *Virchows* Archiv. Bd. **123**. S. 519 (1891).

Aus den Filtraten wird ein Bleiüberschuß mit Salzsäure entfernt. Die vom Bleichlorid abfiltrierte Lösung wird mit Salpetersäure angesäuert (20 *cm*³ auf je 1 *l*) und gekocht. Ist eine dunkelrote Farbe eingetreten, so kühlt man schnell ab, stumpft die Reaktion mit Soda zu schwacher Azidität ab und filtriert die sich hierbei flockig abscheidenden Farbstoffe auf ein Filter ab. Der Filterrückstand wird mit Sodalösung und Wasser gewaschen und nach dem Trocknen am Rückflußkühler mit Chloroform extrahiert. Aus der blaugefärbten Lösung wird das Chloroform am Wasserbad abdestilliert, bis sich eine flockige Abscheidung einstellt. Diese sammelt man nach dem Erkalten der Flüssigkeit auf einem Filter. Der Filterrückstand wird mit kaltem Chloroform nachgewaschen, bis sich das ablaufende Chloroform eben rot färbt. Dann kocht man den Filterinhalt auf dem Wasserbad mit Äther aus, wobei das Indigrot in Lösung geht. Als Verdunstungsrückstand des Äthers hinterbleiben Kristalle, die nach 1—2tägigem Stehen in der ätherischen Mutterlauge aus Äther umkristallisiert werden.

4. Identifikation der blauen und roten Indigoharnfarbstoffe. Bisweilen begegnet man in frischen, häufiger in pathologisch veränderten Harnen (*Groeber*, *Wang* u. a.), auch im Schweiß, zersetztem Mageninhalt, oder in Harnkonkrementen bereits fertig gebildetem Indigblau bzw. Indigrot. Zur Identifikation dieser Farbstoffe verfährt man folgendermaßen:

Für Indigblau: Man sammelt den meist ungelösten Farbstoff durch Filtration auf einem im Trichterhals liegenden Asbestpfropf (eventuell extrahiert man den Harn direkt mit Chloroform und verwendet den Chloroformrückstand) und reinigt ihn durch Waschen mit Wasser und Alkohol (der Alkohol löst hierbei das meist als Begleiter des Indikans vorhandene Indigrot), hierauf trocknet man bei mäßiger Temperatur und benutzt den Pfropf zu folgenden, für Indigblau charakteristischen Reaktionen.

Durch Erhitzen auf 300° bildet sich durch Sublimation ein purpurroter Dampf, der sich an den kalten Stellen des Gefäßes in Form von metallisch glänzenden Kristallen abscheidet. Die Kristalle zeigen im auffallenden Licht Kupferglanzfarbe, im durchfallenden Licht eine tiefblaue Färbung. Mit einer stark alkalischen Traubenzuckerlösung unter Abschluß von Luft (Einbringen des Pfropfes in eine bis zum Hals gefüllte Flasche) tritt Entfärbung ein (Bildung von Indigweiß). Beim Schütteln und an der Luft erfolgt unter Rückbildung des Indigotins wieder Blaufärbung.

Eine Lösung in Chloroform weist einen scharfen Absorptionsstreifen zwischen C und D auf. Eine Lösung in konzentrierter Schwefelsäure (Bildung von Indigblaudi- und -monosulfosäure) zeigt gleichfalls einen Streifen zwischen C und D, der bei größerer Konzentration über D hinausreicht.

Auch die Alkalisalze der Sulfosäuren gehen beim Kochen mit Soda und Traubenzucker in die farblosen Indigweißsulfosäuren über, um sich beim Kontakt mit dem Luftsauerstoff wieder zu bläuen.

Für Indigrot. Man neutralisiert den Indigrot enthaltenden Harn mit Soda und nimmt den Farbstoff durch Ausschütteln in Äther auf

(Trennung vom ätherunlöslichen Urorosein). Der Verdunstungsrückstand des Äthers wird qualitativ geprüft. In gleicher Weise wird auch der Rückstand der Alkoholwaschflüssigkeiten des Indigblaus (siehe oben) geprüft.

Charakteristisch für Indigrot sind: Die Löslichkeit in Alkohol, die Entfärbung dieser Lösung beim Erwärmen mit Traubenzucker und Soda. Die Wiederfärbung im Kontakt mit der Luft, die Bildung einer in Schwefelsäure löslichen Sulfosäure, der Absorptionsstreifen der alkoholischen Lösung im Grüngelb.

II. Sogenannte Skatolfarbstoffe (Skatolrot).

Wohl fälschlicherweise hat man einen als Skatolrot bezeichneten Körper als ein Derivat einer hypothetischen, im Harn vermeintlich zur Ausscheidung kommenden Skatoxylverbindung gehalten. Durch *Maillard* und *Staal* ist diese Anschauung widerlegt, während *Porcher* und *Hervieux* an der Skatoxylprovenienz festhalten.

Die Violettfärbung des Chloroforms bei der Indikanprobe oder die spontane Rot- bis Violettfärbung des Harns bei Salzsäurezusatz, die Kirschrotfärbung mit Salzsäure bzw. das Dunkeln beim Stehen an der Luft werden nicht durch Zersetzung einer fraglichen Skatoxylverbindung veranlaßt. Vielmehr sind andere Farbstoffe an diesen Farbenänderungen beteiligt. Das Skatolrot selbst ist in jüngster Zeit durch *Herter*[1]) als ein Indolderivat aufgeklärt, sein Chromogen war bereits vorher von *Staal* isoliert. Die Identität des Körpers mit dem Urorosein von *Nencki* und *Sieber* (siehe dort) ist außerordentlich wahrscheinlich.

Darstellung des Chromogens aus normalem Harn nach *Staal*[2]) (bzw. *Stokvis*). Der Harn wird mit Ammonsulfat gesättigt und nach maximaler Fällung aller Farbkomponenten filtriert. Das auf dem Wasserbad eingeengte Filtrat wird von ausgeschiedenem Ammonsulfat abgetrennt, mit Essigsäure angesäuert und mit Essigäther ausgeschüttelt. Durch Ausschütteln des Essigätherextraktes mit Wasser wird das Indikan beseitigt. Man setzt dieses Ausschütteln solange fort, bis eine Probe des Wassers keine Reaktion mit Isatinsalzsäure mehr gibt. Hierauf entzieht man dem Essigäther das Skatolrotchromogen durch Ausschütteln mit Kalilauge und neutralisiert die Lösung mit Essigsäure.

Eine Reindarstellung dieses Chromogens ist bis jetzt aus der wässerigen Lösung nicht geglückt. Hingegen gelingt eine Darstellung als Mg-Verbindung direkt aus dem Essigätherextrakt:

Man läßt den von Indikan befreiten Essigäther 24 Stunden lang unter zeitweiligem Umschütteln in einem Kolben mit $MgCO_3$ stehen. Hierauf läßt man den Essigäther in einer Schale verdunsten und extrahiert den Rückstand mit 90%igem Alkohol. Das filtrierte Alkoholextrakt wird

---

[1]) *C. A. Herter,* Über Indolessigsäure als Chromogen des Uroroseins des Harns. Journ. of Biol. chem. Bd. **4**. S. 253 (1908).

[2]) *J. Ph. Staal,* Über das Chromogen des sogenannten Skatolrots im normalen Menschenharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 236 (1905).

abermals zur Trockene verdunstet, der Rückstand nochmals mit 90%igem Alkohol aufgenommen, filtriert und wiederum eingedunstet.

Weder diese Mg-Chromogenverbindung noch das Chromogen des Alkaliextraktes (das durch beträchtliche Mengen von Hippursäure verunreinigt sein kann) sind bis jetzt als chemische Individuen erwiesen. Der Körper aber, der nach *Staal* keine gepaarte Schwefelsäure (bzw. Glukuronsäure) und kein Skatol enthält, ist dadurch ausgezeichnet, daß er mit Salzsäure und einem Oxydans (z. B. 1—2 Tropfen 0·5%iges KNO_2) in einen Farbstoff übergeht, der in Äther und Chloroform unlöslich (Gegensatz zu Indigrot), in Amylalkohol löslich ist und dessen rote Farbe in saurem Wasser durch Alkali in Braun umschlägt, durch Zink entfärbt wird und beim Ansäuern bzw. durch Oxydation wiederkehrt. Die frische Farbstofflösung zeigt 2 Absorptionsstreifen zwischen D und E.

Die Eigenschaften erinnern lebhaft an jene des Uroroseins (siehe dort).

Darstellung des sogenannten **Skatolrots** aus Harn nach Skatolfütterung (*Grosser*[1]) bzw. Einspritzungen (*Porcher* und *Hervieux*[2]).

a) Qualitativer Nachweis: Harn der Skatolperioden (auch sicher indikanfreier Harn) wird mit ca. $^1/_{10}$ seines Volumens Bleiessig gefällt, filtriert und mit dem gleichen Volumen Salzsäure versetzt. Nach einigen Stunden hat sich eine tiefrote Färbung gebildet. Der Farbstoff kann mit Amylalkohol gänzlich, mit Essigäther partiell extrahiert werden und zeigt die oben für den aus dem Chromogen dargestellten Farbstoff bereits aufgezählten Eigenschaften (vgl. bei Urorosein). Die Angaben von *Porcher* und *Hervieux* enthalten im wesentlichen die gleichen Daten.

b) Versuch einer Isolierung: Der Harn wird mit $^1/_8$ seines Volumens rauchender Salzsäure zum Sieden erhitzt, mit 200 cm^3 heißer $BaCl_2$-Lösung versetzt und 10 Minuten gekocht. Nach 24 Stunden hat das sich abscheidende Baryumsulfat den Farbstoff niedergerissen. Das auf dem Filter gesammelte und mit heißem Wasser gewaschene Salz gibt den Farbstoff an heißen Alkohol. Die alkoholische Lösung wird eingedunstet und der Trockenrückstand zuerst mit Chloroform von Indikanbeimischungen gereinigt. Hierauf läßt man eine Extraktion mit Aceton folgen, wobei ein Anteil in Lösung geht und gewinnt eine alkohollösliche und eine alkohol- und acetonlösliche Fraktion. Von diesen bisher nicht weiter erforschten Substanzen (oder Substanzmengen) scheint die alkohollösliche ein Skatolderivat zu sein; der Befund steht also in gewissem Gegensatz zu den Beobachtungen von *Staal*.

Nach den jüngsten Beobachtungen *Herters*[3]) ist das farblose Chromogen des Uroroseins, das eine Indolessigsäure ist, zugleich die Muttersubstanz

[1]) *P. Grosser*, Über das Verhalten von zugeführtem Indol und Skatol im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44**. S. 320 (1905).

[2]) *Ch. Porcher* und *Ch. Hervieux*, Untersuchungen über das Skatol. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 486 (1905); vgl. L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent. Schleicher frères. Comptes rendus de l'Acad. des sciences de Paris 1903. p. 138.

[3]) *C. A. Herter*, Über Indolessigsäure als Chromogen des Uroroseins des Harns. Journ. of Biol. Chemistry. Vol. 4. p. 253 (1908).

des sogen. Skatolrots. Die Zugehörigkeit des aus ihm entstehenden Farbstoffes zu den Skatolderivaten wird immer dadurch vorgetäuscht, daß der farbige Körper aus der Indolessigsäure beim Erwärmen unter CO_2-Verlust Skatol liefert.

$$\text{Indol-}CH_2.COOH \longrightarrow \text{Indol-}CH_3 + CO_2.$$

B. Farbstoffe in Geweben. Pigmente.

Die Mehrzahl der intra- und extrazellular gelegenen Gewebsfarbstoffe ist chemisch nicht aufgeklärt. Nur für eine beschränkte Anzahl ist durch qualitative Reaktionen eine Gruppenzugehörigkeit festgestellt. Wir stellen solche Substanzen an die Spitze dieses Absatzes.

I. Farbstoffe als Verwandte des Hämoglobins oder der Gallenfarbstoffe.

Histohämatine sind nach *Mac Munn*[1]) rote Farbstoffe, die sich bei einigen Spongien und Aktinienarten, ferner auch in Ovarien und im Verdauungstraktus von Seesternen (Uraster rubens) finden. Man gewinnt diese Körper durch Extraktion mit Kalilauge oder Alkohol und prüft die alkalischen oder sauren Lösungen spektroskopisch auf eine Ähnlichkeit der Spektralbilder mit jenen der Hämatin- bzw. Hämochromogenlösungen. Die Bilder, die in den Farbstofflösungen entstehen, zeigen nach Ammoniumsulfidzusatz Identität mit den Absorptionsstreifen des Hämochromogens, nach Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure mit jenen des Hämatoporphyrins.

Selbstverständlich genügt die Identität beider Spektralbilder nicht, um eine chemische Identität beider Substanzen festzustellen. Es ist denkbar, daß es sehr verschiedenartige Körper vom Typus des Hämatins gibt.

Den Hämatinderivaten (Hämatoporphyrin) scheint auch der als **Turacin** bezeichnete rotviolette Farbstoff nahezustehen, der sich in den Flügelfedern von einigen Spezies der Musophagiden (*Church*[2]), *Gamgee*[3]) findet. Die Darstellung erfolgt durch Extrahieren mit Alkalien (vielleicht nicht ohne chemische Veränderung) und mehrfaches Umfällen mit Säuren. Der Körper erwies sich als kupferhaltig. Die Zugehörigkeit zu hämatin-

---

[1]) *C. A. Mac Munn*, Observations of the Chromatology of Actiniae. Proc. roy. Soc. Vol. 38. p. 85 (1885). Philosoph. Transactions. Vol. **176**. p. 641 (1885). — Derselbe, On the chromatology of some british Sponges. Journ. of phys. Vol. **9**. p. 1 (1888); Proc. the Physiol. Soc. Vol. **11**, **12** (1887).

[2]) *A. H. Church*, Untersuchungen über Turacin, ein tierisches, kupferhaltiges Pigment. I. II. Chem. News. Vol. **19**. p. 265 (1869). Vol. **65**. p. 218 (1892).

[3]) *A. Gamgee*, Über die Beziehung von Turacin und Turacoporphyrin zu den Blutfarbstoffen. Lancet. 11. Juni 1896; vgl. Proc. roy. Soc. Vol. **59**. p. 339 (1896).

ähnlichen Substanzen ist noch unbewiesen. Ein durch Kochen von Hämatoporphyrin mit kupferhaltigem Ammoniak entstehender Farbstoff zeigt dem Turacin ähnliche Eigenschaften (*Laidlow*[1]); auch läßt sich aus dem Turacin mit Säuren kupferfreies Turacoporphyrin gewinnen.

Gallenfarbstoffähnliche Farbstoffe bei niederen Tieren werden nach den für diese Körper gültigen Angaben extrahiert und identifiziert. Für Biliverdin verwendet man sauren Alkohol als Extraktionsmittel. Die *Gmelin*sche Farbenreaktion liefert ein Kriterium für die Gruppenzugehörigkeit dieser Substanzen. Den Gallenfarbstoffen nahestehend (d. h. durch eine positive *Gmelin*sche Probe ausgezeichnet) scheinen die Pigmente zu sein, die sich in den Flügeln mancher Schmetterlinge und Raupen (Vanessaarten) vorfinden (*v. Linden*[2]).

Man extrahiert diese Farbstoffe mit kaltem Wasser und fällt mit Alkohol. Der Niederschlag wird abermals in Wasser gelöst und kristallisiert in klinorhombischen Blättchen oder feinen Nadeln in gelbroter bis roter oder grüngelber Farbe. Der Körper ist eisenhältig, gibt Eiweißreaktionen und reduziert.

II. Farbstoffe aus der Klasse der Purinkörper.

Am Aufbau gewisser Pigmente mancher (keineswegs aller) Lepidopterenarten (Kohlweißling, Zitronenvogel aus der Klasse der Pieriden) ist die Harnsäure beteiligt (*Hopkins*[3]), *Griffiths*[4]). In dem Hautpigment der Kapitelliden und in den Schuppen von Knochenfischen (Silbersubstanz) findet sich reines Guanin. Ohne Zweifel dürften noch zahlreiche andere Pigmente der Puringruppe angehören. Die Identifikation einer solchen Zugehörigkeit geschieht natürlich nach den für die Bestimmung der Purinkörper gültigen Maßnahmen.

Als Beispiel einer solchen Bestimmung sei das Verfahren von *Hopkins*[5]) für das weiße Pigment der Kohlweißlingflügel angeführt:

Die Flügel werden zuerst mit Alkohol und Wasser behandelt und dann einmal kurz mit Wasser aufgekocht. Hierauf behandelt man den Rückstand mit verdünntem Ammoniak oder stark verdünnter Sodalösung. Die klar filtrierte Lösung wird angesäuert, die Fällung mit

---

[1]) *P. Laidlow*, Einige Beobachtungen über Blutpigmente. Journ. of phys. Vol. **31**. p. 464.

[2]) *M. Gräfin v. Linden*, Morphologische und physiologisch-chemische Untersuchungen über Pigmente der Lepidopteren. *Pflügers* Arch. Bd. **98**. S. 1 (1903).

[3]) *F. G. Hopkins*, The pigments of the Pieridae. Contribution to the study of excretory substances, with function in ornaments. Philosoph. Transactions. London 1894. Vol. **186**. p. 661.

[4]) *A. B. Griffiths*, Recherches sur les couleurs de quelques insectes. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. T. **115**. p. 958 (1892); Chem. News. T. **66**. p. 305; Journ. chem. Soc. T. **64**. p. 236.

[5]) *F. G. Hopkins*, Pigments of Lepidoptera. Nature. T. **45**. p. 581 (1892).

Alkali gelöst und durch Umfällen mit Säure noch mehrfach gereinigt. Die Identität der Harnsäure muß durch Elementaranalyse, die Zugehörigkeit zur Puringruppe durch Murexidprobe erbracht werden.

Das gelbe Pigment des Zitronenvogels (Gonopteryx rhamni) erwies sich gleichfalls als ein Körper, an dessen Aufbau die Harnsäure beteiligt ist. Da derselbe eine äußerst spezifische Eigenschaft, die Lepidoporphyrinbildung, zeigt, sei darüber kurz berichtet.

Die gelben Flügel werden zuerst mit Alkohol und mit kaltem Wasser extrahiert. Durch Auskochen des Rückstandes mit destilliertem Wasser entsteht eine gelbe Lösung, aus der sich der gelbe Farbstoff beim Abkühlen amorph abscheidet. Der Körper wird durch mehrfaches Umfällen mit Säuren aus seiner alkalischen Lösung gereinigt.

Die Gegenwart von Harnsäure wird durch die Murexidprobe in den Abdampfrückständen nach vorangegangener Hydrolyse mit kalter, konzentrierter Salpetersäure erbracht.

Elementarzusammensetzung des gelben Pigmentes: C 38·13, H 3·47, N 37·11, O 21·29 p. c.

Lepidoporphyrinreaktion. Der gelbe Farbstoff verwandelt sich beim Erwärmen mit 20%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbad in einen purpurroten Körper, der auch in konzentrierter Schwefelsäure löslich ist und beim Verdünnen oder Neutralisieren seiner stark sauren Lösung flockig ausfällt.

III. Farbstoffe aus der Gruppe der Lipochrome.

Lipochrome sind gelbe bis orangerote und rote Substanzen, die in der niederen und höheren Tierwelt weit verbreitet sind. Ihr chemischer Aufbau ist ganz unaufgeklärt, ihre Charakteristik beruht nur auf der Feststellung gemeinsamer Klassenmerkmale. Da nur diese die Grundlagen für eine Isolierung wie eine Identifikation eines Körpers als „ein Lipochrom“ bilden, so seien sie kurz angeführt:

Reine Lipochrome sind unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Ölen und Fetten.

Die Lösungen sind gelb bis rot gefärbt, bleichen aber an der Luft (Sauerstoffkontakt) und im Licht. Charakteristisch und zur Reinigung und Trennung von Lipoiden verwertbar sind die Verbindungen dieser Körper mit Alkalien und Erdalkalien (Seifen), welche stabil und in der Hitze nicht zersetzlich sind.

Diese Alkaliverbindungen sind ferner löslich in Äther und Petroläther, unlöslich in Alkohol und Alkalien, so daß sie von den erstgenannten Solventien aus anderen Lösungen aufgenommen werden. Die Lösungen in Chloroform sind gleichfalls sehr stabil. Aus ihnen geht der Farbstoff nicht in eine Alkalilösung über (Gegensatz zu Bilirubin).

Zur Identifikation dient das Verhalten der Spektralerscheinungen und der Färbung durch konzentrierte Säuren. Alle Lipochrome zeigen 2 oder 3 Absorptionsstreifen im blauen und violetten Teil des Spektrums.

in Alkoholätherlösung liegt ein Streifen in der Nähe der Linie F, weiter nach G als b reichend, ein zweiter Streifen zwischen F und G.

Mit konzentrierter Salpetersäure oder Schwefelsäure entstehen blaue, blaugrüne, zuletzt violette bis gelbfahle Färbungen.

Darstellung. Nicht alle Lipochrome sind bisher in kristallisierter Form isoliert worden. Vermutlich aber liegt die Unkristallisierbarkeit vieler dieser Substanzen in ihrer Verunreinigung mit kristallisationshemmenden Substanzen (Lipoiden, Fetten) und nicht in einer elementaren Wesensdifferenz.

Das lipochromhaltige Material (gelb gefärbte Organbestandteile) wird zuerst bei niederer Temperatur getrocknet und zu einem feinen, rot oder gelb gefärbten Pulver zerrieben. Ist das Substrat kalkhaltig (z. B. Crustaceenpanzer), so kann man eine Entkalkung durch verdünnte Mineralsäure vorangehen lassen. Gelingt das Trocknen nicht, so können auch die fein zerteilten Protoplasmateile verarbeitet werden. Alle derartigen vorbereitenden Manipulationen bezwecken ja nur eine Erleichterung der folgenden Extraktionen und müssen von Fall zu Fall variiert werden. Ebenso lassen sich auch für die Wahl des Extraktionsmittels keine generellen Regeln geben. Am meisten gebräuchlich ist die Verwendung von heißem absolutem Alkohol oder von Alkohol-Äther zu gleichen Teilen oder von Chloroform. Auch Äther und Petroläther allein sind verwendbar. Es entstehen dann meist rote Lösungen, bisweilen auch gelbe Lösungen, z. B. ist die Alkohollösung des Crustaceorubins rot, jene in Benzol oder Äther gelb. Dabei sind die in Lösung befindlichen Körper identisch.

Zu präparatorischen Zwecken verfährt man dann so: Man überläßt eine Probe der Extraktionslösung der Verdunstung, um auf die Möglichkeit der Spontanabscheidung in Kristallform zu prüfen. Eine solche gelingt eben dann, wenn das richtige Extraktionsmittel gewählt ist, z. B. das Lipochrom der Flagelate: Euglena sanguinea aus Alkohol (*Kutscher* [1]) oder das Crustaceorubin aus Panzern von Hummer aus Alkohol-Äther (*Pouchet* [2]) oder Lutein aus Chloroform. Hinterbleibt aber eine fettige Masse, die Lipoide oder Cholesterin enthält, so wird die etwas eingeengte alkoholische Lösung durch Zusatz von Kali am Rückflußkühler geraume Zeit gekocht (zur Verseifung von Fetten). Aus der Lösung vertreibt man den überschüssigen Alkohol. Der Rückstand der Alkali-Lipochromverbindung wird nun mit Kochsalz gesättigt und mit Äther oder Petroläther ausgeschüttelt. Beide Solventien sind zu prüfen, da bisweilen der Petroläther versagt. Der Petrolätherrückstand wird mit Säure behandelt und das freie Lipochrom in Alkohol oder Äther oder Schwefelkohlenstoff aufgenommen. Auch hier wende man möglichst viele Solventien an, um eine Kristallisation zu ermöglichen. Ist man gewiß, daß außer dem Lipochrom kein anderer gelber Farbstoff

[1]) *F. Kutscher*, Beitrag zur Kenntnis der Euglena sanguinea. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **24**. S. 360 (1898).

[2]) *G. Pouchet*, Sur le changement de coloration provoqués expérimentalement chez les Crustacées. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. T. **74**. p. 757 (1872); Journ. d'Anat. et de Physiol. T. **12**. p. 10 (1876).

in das erste alkoholische Extrakt übergegangen ist, so kann man den Rückstand dieses Extraktes auch mit Sodalösung kochen. Durch Säurezusatz wird der Reinfarbstoff als wasserunlöslich gefällt und dann mit Chloroform oder Schwefelkohlenstoff ausgeschüttelt.

Zur Identifikation dienen die eingangs erwähnten Reaktionen. Nach dieser prinzipiell skizzierten Methode sind Lipochrome bei Protozoen, Spongien, Cölenteraten, Echinodermen, Würmern, Mollusken, Crustaceen, Insekten, Kaltblütern und Warmblütern isoliert worden.

Für einige dieser Substanzen sind von ihrem Entdecker *Krukenberg* spezielle Namen vorgeschlagen, wie: Zoonerythrin beim Goldfisch, Zoonfulvin, Coriosulfurin, Lipochorin beim Laubfrosch oder Zoorubin, Zoofulvin, Picofulvin, Zoonerythrin etc. für die gelben Farbstoffe in Schnäbeln und Läufen der Vögel. Die Berechtigung einer solcher Nomenklatur ist durch chemisch-analytische Untersuchungen nicht gestützt.

Für einige wenige besser studierte und reiner isolierte Lipochrome mögen hier noch einige methodische Ergänzungen folgen, vor allem auch für die Lipochrome der Säugetiere.

Crustaceorubin und **Cyanokristallin der Panzer von Crustaceen.** Beide Substanzen sind Lipochrome. Der letztere geht beim Kochen, Erwärmen oder Behandeln mit Säure in den ersteren über.

Er findet sich auch in reichlicher Menge in der Hypodermis vor.

Die Kristallisation des Crustaceorubins gelingt leicht durch Extraktion mit Alkohol-Äther zu gleichen Teilen und Verdunsten *(Pouchet*[1]*), Krukenberg)*.

Das labile Cyanokristallin wird ohne Verwandlung dem schwarzblauen, von der Hypodermis getrennten Hummerpanzer mit Wasser entzogen, wenn nur die Konzentration der entkalkenden Salzsäure (0·1%ig) so gewählt ist, daß keine überschüssige, freie, von Kalk nicht neutralisierte Säure vorhanden ist. In diesem Fall gewinnt man eine blaue Lösung, die sich beim Erwärmen über violett allmählich rot färbt (unter Umwandlung in Crustaceorubin). Ein geeignetes Extraktionsmittel stellt auch eine verdünnte Ammoniumchloridlösung dar (0·1%), aus welcher der Farbstoff in Form blauer Flocken durch Sättigen mit Ammonsulfat ausgesalzen wird. Die Flocken sind auf dem Filter leicht zu sammeln und in Alkohol und Äther mit einer burgunderroten Farbe löslich (*Marion Newbigin*[2]).

Tetronerythrin. Mit diesem Namen bezeichnet man ein Lipochrom, das als roter Farbstoff in der sogenannten „Rose" der Vögel aufgefunden wurde, und dann auch im Krabbenblut *(Jolyet* und *Regnard*) und im Crustaceenblut (*Halliburton*[3]) beschrieben wurde.

---

[1]) *G. Pouchet,* Sur le changement de coloration provoquées expérimentalement chez les Crustacées. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. T. **74**. p. 757 (1872); Journ. d'Anat. et de Physiol. T. **12**. p. 10 (1876).

[2]) *Marion Newbigin,* The pigments of decapod Crustacea. Journ. of Phys. Vol. **21**. p. 237 (1897).

[3]) *W. D. Halliburton,* On the blood of decapod Crustacea. Journ. of Phys. Vol. **6**. p. 300 (1885).

Das tetronerythrin- und zugleich hämocyaninhaltige Blut der Crustaceen wird mit einer überschüssigen Menge Alkohol versetzt. Das Filtrat der entstehenden Eiweißfällung wird durch Eindampfen auf dem Wasserbad von Alkohol befreit. Beim Einengen scheidet sich das wasserunlösliche Lipochrom in Form von roten Flocken ab, die auf dem Filter gesammelt und in Alkohol oder Äther gelöst werden. Eine Kristallisation ist bis jetzt nicht gelungen.

Bisweilen gehen bei den geschilderten Extraktionen lipochromhaltiger Organe zwei Lipochrome in Lösung, deren Trennung gelingen kann. Ob es sich um Modifikationen eines einheitlichen Körpers oder physiologische Zwischenstufen zweier verschiedener Körper handelt, ist nicht entschieden. Die Trennung solcher Fraktionen gelang für einen roten Farbstoff von Copepoden (Diaptomus bacillifer) (*Zopf*[1]) und für das Vitellolipochrom aus Eiern der Seespinne (Maja Squinado) (*Maly*[2]). Die Fraktionierungsversuche sind in beiden Fällen verschieden und hier einer Erwähnung wert.

Für **Copepoden:** Man extrahiert mit kochendem Alkohol-Äther. Aus dem Extrakt vertreibt man den Äther durch Erwärmen und verseift die Alkohollösung nach Zusatz von Natronlauge. Hierauf entfernt man den Alkohol auf dem Wasserbad und salzt die Seife durch Sättigen mit Kochsalz aus. Die sich in Form von tiefroten Massen abscheidende und obenauf schwimmende Masse wird mit Äther, Petroläther oder Schwefelkohlenstoff extrahiert, wodurch ein „gelbes Carotin" in Lösung geht. Der Seifenrückstand wird angesäuert und gibt nun an Äther ein „rotes Carotin". Beide Körper sollen Verschiedenheiten der Spektralstreifen aufweisen. Die Lipochromreaktionen zeigt nur das „rote Carotin" (Diaptomin) vollkommen.

Für **Vitellolipochrome** niederer Tiere *(Maly)*:

Die rotgefärbten Dotterträubchen der Seespinne werden bei 30—40° getrocknet, die trockene Masse wird zu einem Pulver zerrieben und mit absolutem Alkohol extrahiert. Der heiße alkoholische Auszug wird mit heißem Barytwasser gefällt. Es entsteht ein Niederschlag der Barytverbindung des Vitellorubins. Derselbe wird noch heiß auf dem Filter gesammelt, mit Alkohol gewaschen und mit verdünnter Salzsäure zerlegt. Es kommt hierbei zur Abscheidung einer rot gefärbten, wasserunlöslichen Masse, die zugleich mit unlöslichen Fettsäuren auf der Flüssigkeit schwimmt. Dieselbe wird abgeschöpft und feucht mit Magnesia usta innig verrieben. Die so gewonnene Masse wird erst mit kaltem Alkohol gewaschen und dann mit Äther oder Chloroform extrahiert. Die rot gefärbte Lösung wird mit Alkohol gefällt. Das gefällte Magnesiumsalz wird mit Salzsäure zersetzt und dann mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand stellt das reine Lipochrom dar. Das Vitellolutein, dessen Baryumsalz in Wasser löslich ist, wird in dem

---

[1]) *W. Zopf*, Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Tiere. Leipzig. 3. Heft. Über Produktion von carotinartigen Farbstoffen bei niederen Tieren. S. 26 (1893).

[2]) *R. Maly*, Über die Dotterpigmente. Monatsh. f. Chemie. Bd. 2. S. 18 (1881).

Filtrat der ersten Barytfällung mit Salzsäure in Freiheit gesetzt und mit Ligroin extrahiert.

Beide Körper scheinen verschieden zu sein. Nur das Vitellorubin erfüllt alle Lipochromeigenschaften, da es im Gegensatz zu dem Vitellolutein die Verbindung mit Alkalien und alkalischen Erden eingeht.

Vitellorubin zeigt einen breiten Absorptionsstreifen bei F. Vitellolutein zwei Streifen, der eine bei F, der andere zwischen F und G.

Die oben geschilderte Darstellungsmethode dürfte auch für andere Lipochrome erfolgreich anwendbar sein.

Lipochrome der Säugetiere werden auch als **Luteine** bezeichnet. Sie sind die Träger der gelben Farbe so mancher Gewebe und finden sich im Fettgewebe, im Eigelb, im Blutserum[1]) und im Corpus luteum. Eine Reindarstellung dieser Körper ist bis jetzt nur für das Lutein der Corpora lutea der Kuh, und zwar in Kristallform gelungen. Die Isolierung einheitlicher Körper ist hier vor allem durch den Reichtum an Fetten oder Lipoiden gestört, die sich kaum oder nur schwer beseitigen lassen.

Lutein wird aus frischen, fein zerkleinerten Corpora lutea mit heißem Chloroform extrahiert (*Staedeler* und *Holm*[2]). Aus dem schon spontan kristallisierenden Verdunstungsrückstand können Fettbestandteile durch vorsichtiges Waschen oder Abspülen mit verdünntem Alkohol oder Äther notdürftig beseitigt werden.

Aus dem hier Gesagten geht deutlich hervor, daß die Erforschung der Luteine noch dringender Bearbeitung bedarf, die durch das Vorhandensein von hinreichendem Material nur begünstigt würde. Man wird die Methoden erheblich erweitern und spezialisieren müssen: das hier erwähnte soll nur Anhaltspunkte bieten. Eine scharfe Abgrenzung von den noch zu besprechenden anderen gelben Farbstoffen existiert noch nicht.

IV. Farbstoffe aus der Gruppe der Melanine.

In dieser Gruppe faßt man eine Anzahl schwarzer oder schwarzbrauner Körper zusammen, die bei Wirbeltieren und Wirbellosen unter normalen und pathologischen Bedingungen vorkommen. Die Zusammengehörigkeit der schwarzen Pigmente zu einer einheitlichen Gruppe ist nicht allein durch das Farbenmerkmal, sondern auch durch die höchstwahrscheinliche generelle Übereinstimmung ihrer Zusammensetzung aus zyklischen, dem Eiweißmolekül entstammenden Komplexen gerechtfertigt. Sie entstehen zum Teil aus farblosen Chromogenen, die ebensolche aromatische und heterozyklische Eiweißderivate sind und bei ihrer meist fermentativen Umwandlung in Melanine unter gewissen Bedingungen auch akzessorische Gruppen (S- oder Fe-haltige Komplexe oder auch verzweigte aliphatische

[1]) U. a. *L. Zoja,* Über die Gegenwart von Bilirubin und Lutein im menschlichen Serum. Real. Istit. Lombardo d. scienze e lettere (2). T. **27**. p. 839 (1904).

[2]) *G. Staedeler,* Notiz über den Farbstoff des Eigelbs. Journ. f. prakt. Chemie. Bd. **100**. S. 148 (1866).

Ketten) in diesen Umwandlungsprozeß durch Kondensation einbeziehen können.

Die Darstellung reiner Melanine ist wegen ihrer Unlöslichkeit in indifferenten Lösungsmitteln eine schwierige. Die Schwierigkeit wird erhöht durch die nur schwer zu beseitigende Anwesenheit von Eiweißbeimischungen und die relative Labilität der Melanine gegen Alkali.

Man hat früher im Prinzip zwei Darstellungsmethoden eingehalten: Im einen Fall hat man die schwarzen Pigmente durch Behandeln mit kalter oder warmer Lauge in Lösung gebracht und so von Eiweißkörpern getrennt. Eine Reinigung hat man alsdann durch wiederholtes Umfällen der Melanine mit Säuren aus alkalischer Lösung zu erzielen versucht. Im anderen Fall hat man die säureunlöslichen Körper dadurch vom Eiweiß befreit, daß man die pigmenthaltigen Gewebsbestandteile durch Hydrolyse mit starken Säuren vom Eiweiß trennte, eventuell die Säurehydrolyse der Proteine mit einer Fermenthydrolyse (Pepsin, Trypsin) kombinierte und so einen in Säuren unlöslichen Pigmentrückstand gewann. Diesen Rückstand hat man schließlich zur Reinigung mit Alkali behandelt und durch Umfällen mit Säure gereinigt.

Schon die Vergleichung von Analysenzahlen der nach beiden Methoden dargestellten Präparate hat keine restlose Übereinstimmung dieser Körper gezeigt. Die Differenzen werden dadurch erklärt, daß die Mehrzahl der Melanine offenbar durch die Behandlung mit Alkali eine Veränderung ihrer Zusammensetzung erleidet. Das genuine Melanin geht hierbei in eine alkalilösliche „Melaninsäure" über, die andere Zusammensetzung aufweist. Mit Rücksicht darauf ist ein Vergleich aller dargestellten Melanine, die bald mit, bald ohne Verwendung von Alkalibehandlung dargestellt sind, unstatthaft.

Wir sehen daher an diesem Ort davon ab, alle Methoden der Darstellung, die für schwarze Pigmente der verschiedensten Herkunft von den verschiedenen Autoren angewandt sind, detailliert zu besprechen. (Eine Zusammenstellung der älteren Arbeiten findet sich bei *v. Fürth*[1]) und bei *v. Fürth* und *Jerusalem*[2]), vgl. auch S. 765, Note 4). Wir begnügen uns vielmehr, für eine Darstellungsmethode einige Beispiele zu geben, die eine allgemeine Anwendung mit dem Resultat relativ reiner Endprodukte gestatten.

Vorbereitungen: Bei der Isolierung von Melaninen aus tierischen Geweben werden diese zuerst zur Befreiung von Fetten einer Extraktion mit Alkohol und Äther unterworfen.

I. Methoden der mechanischen Isolierung (anwendbar für das Chorioidealpigment).

---

[1]) *O. v. Fürth,* Physiologische und chemische Untersuchungen über melanotische Pigmente. (Sammelreferat.) Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anatomie. Bd. **15**. S. 617 (1904).

[2]) *O. v. Fürth* und *E. Jerusalem,* Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **10**. S. 131 (1907). (Literatur.)

Aus der Chorioidea des Auges.[1]) Man eröffnet frische Rinderaugen durch einen Scherenschlag, teilt dann das Auge in zwei Hälften und entfernt die Glaskörperteile durch leichtes Schwenken unter Wasser. Hierauf entfernt man unter Wasser durch Auspinseln mit einer Federfahne oder durch gelindes Reiben mit einem armierten Glasstab die Pigmentkörnchen aus den dunkel gefärbten Teilen der Augenhäute.

Hierbei wird der größere Teil des Pigmentes, besonders der Anteil des Corpus ciliare in Wasser aufgeschwemmt: nur sehr langsam setzt sich das Pigment zu Boden. Die vereinigten tiefschwarzen Flüssigkeiten werden durch ein Seidenfilter geschickt. Durch Zusatz des gleichen Volums einer auf 80° erwärmten gesättigten Ammonsulfatlösung und längeres Erwärmen auf dem Wasserbad wird das Pigment ausgeflockt, so daß es sich zu Boden senkt.

Ein nicht unbeträchtlicher Pigmentanteil läßt sich aus der Chorioidea bulbi nicht herauspinseln. Um ihn zu gewinnen, zieht man die Chorioidea mitsamt der Retina von dem Bulbus ab, zerkleinert die Gewebsfetzen fein und unterwirft die ganze Masse einer mehrtätigen Verdauung mit Pepsinsalzsäure und dann mit Trypsin. Hierbei scheidet sich das Pigment zuletzt in feinen Körnchen am Gefäßboden ab. Durch Dekantieren und langdauerndes Waschen mit Wasser, Abschleudern in der Zentrifuge und schließliches Nachbehandeln mit Alkohol und Äther gewinnt man ein hellbraunes, staubfeines Pulver. Eventuell wiederholt man an diesem die Trypsinverdauung oder auch die genannte Reinigung durch Umfällen aus Alkalilösung mit Säure.

II. Methode der Säurehydrolyse (anwendbar für Hippomelanin melanotischer Drüsen des Pferdes oder melanotischer Tumoren anderer Herkunft nach *v. Fürth* und *Jerusalem*[2]).

Die Methode führt zu unverändertem Pigment.

Frische, melanotische Lymphdrüsentumoren von Schimmeln werden von anhaftendem Gewebe befreit und bis zu ihrer Verarbeitung in Alkohol aufbewahrt. Die zerkleinerte Tumorenmasse wird alsdann mit konzentrierter, rauchender Salzsäure zerkocht. Die Pigmentkörner bleiben hierbei vollkommen ungelöst und werden nach Wasserzusatz zu der Hydrolysenmischung auf einem gehärteten Filter gesammelt und durch Waschen mit Wasser von löslichen braunen Bestandteilen befreit. Hierauf wird nochmals mit kochender rauchender Salzsäure extrahiert, abfiltriert, mit Wasser verrieben und ausgekocht, dann abermals abgesaugt, hierauf wird mit heißem siedendem Alkohol und Äther extrahiert und getrocknet.

Das so dargestellte Produkt ist sicher von dem Phymatorhusin von *Nencki* und anderen Autoren verschieden, da es in Alkalilauge ganz unlöslich ist. Dadurch ist es auch von den „Melanoidinsäuren“ aus Eiweiß

---

[1]) *E. Landolt*, Über die Melanine der Augenhäute. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 28. S. 407 (1899).

[2]) *O. v. Fürth* und *E. Jerusalem*, Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **10**. S. 131 (1907).

zu unterscheiden. Der Körper geht in eine alkalilösliche Modifikation (Melaninsäure) erst durch eine mehrstündige Behandlung mit der 6—10fachen Menge Ätzkali über. Er gewinnt dann die Eigenschaften jener Melanine, welche z. B. *Nencki, Berdez* und *Sieber* als Hippomelanin dargestellt haben. Es muß daher für alle älteren Präparate geschlossen werden, daß sie erst durch sekundäre Veränderung der Zellpigmente entstanden sind.

III. Methoden der Alkalihydrolyse und Alkaliextraktion (anwendbar für Melanine der Haare, der Haut (*Abel* und *Davis*[1]), melanotische Tumoren (Phymatorhusin von *Nencki*[2]), *Zumbusch*[3]) u. a.).

Darstellung aus Haaren nach *Spiegler.*[4]) Große Mengen Roßhaar (5 *kg*) werden mit $^1/_2$%iger Sodalösung gewaschen und sodann mit der 5fachen Menge 5%iger Kalilauge bis zu ihrer Lösung gekocht. Nach etwa 4 Stunden wird das Pigment aus der erkalteten Lösung durch einen großen Überschuß von konzentrierter Salzsäure als eine teigige, sich am Boden bald absetzende Masse gefällt. Durch Kolieren wird diese Masse von der Flüssigkeit getrennt, mit Wasser und verdünnter Salzsäure gut gewaschen und schließlich nochmals zur Befreiung von Eiweißresten 8—10 Stunden mit 5%iger Salzsäure auf dem Sandbade unter Rückflußkühlung gekocht. Hierauf filtriert man noch heiß und trocknet den feinen braunen Filterrückstand in einer Schale auf dem Wasserbad.

Zur weiteren Reinigung verreibt man den trockenen Körper in einer Reibschale mit konzentriertem wässerigem Ammoniak. Die tiefbraune abfiltrierte Lösung wird mit Salzsäure gefällt, der ausfallende Pigmentkörper abfiltriert. Lösen und Fällen wird ein zweites und drittes Mal wiederholt. Die letzte Fällung wird auf dem Filter gesammelt, auf dem Wasserbad und im Toluolbad getrocknet und dann zu einem feinen Pulver zerrieben. Hierauf löst man durch Zerreiben in konzentrierter Schwefelsäure, filtriert über Glaswolle und scheidet das Pigment durch Eingießen der Filtrate in viel kaltes destilliertes Wasser ab. Den pulverigen Niederschlag wäscht man bis zur Schwefelsäurefreiheit der Waschflüssigkeiten und trocknet dann. Die Umfällung aus konzentrierter Schwefelsäure wird ein zweites Mal wiederholt. Zur Befreiung von elementarem Schwefel wird schließlich das trockene Pigment aufeinanderfolgend mit Alkohol, reinem Schwefelkohlenstoff und Äther extrahiert.

Elementarzusammensetzung:

aus Pferdehaar	C 60·36,	H 5·80,	N 11·26,	S 3·22:
aus Schafwolle	„ 50·91,	„ 6·15,	„ 10·21,	„ 2·91.

---

[1]) *J. Abel* und *W. S. Davis,* On the pigments of the negros skin and hair. Journ. of exp. Med. Vol. 1. p. 361.

[2]) *Berdez* und *M. Nencki,* Über die Farbstoffe melanotischer Sarkome. Arch. f. (exp. Pharm. u. Path. Bd. 20. S. 346 (1886). — *M. Nencki* und *N. Sieber,* Weitere Beiträge zur Kenntnis der tierischen Melanine. Ibid. Bd. 24. S. 17 (1887).

[3]) *L. v. Zumbusch,* Beiträge zur Charakteristik des Sarkomelanins vom Menschen. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 36. S. 511 (1902).

[4]) *E. Spiegler,* Über das Haarpigment. Beitr. z. chem. Phys. u. Path. Bd. 4. S. 40 (1904).

Ein farbloses Chromogen (Pigmentsäure) läßt sich in analoger Weise aus Schimmelhaaren und weißer Schafwolle darstellen *(Spiegler)*. Die Darstellung gleicht der vorgenannten, nur darf das nur grau gefärbte Pigmentpulver nicht mit Ammoniak behandelt werden, da es sich hierbei ganz schwarz färbt. Man reinigt daher diesen Körper nur durch Ausfällen mit viel Wasser aus der Lösung in konzentrierter Schwefelsäure. Das hierbei frisch gefällte Pulver ist nahezu weiß, nimmt aber nach längerem Stehen eine dunklere, graue Färbung an.

Elementarzusammensetzung:

aus Schimmelhaaren C 48·51, H 7·06, N 12·58, S 2·80%
aus Schafwolle „ 55·45, „ 7·38, „ 10·87, „ 2·30%

Die Darstellungsmethoden aus Haarpigment, welche u. a. von *Sieber* und von *Abel* und *Davis* [1]) verwendet wurden, führen zu anderen Pigmenten inkonstanter Zusammensetzung (siehe oben).

Aus Negerhaar C 52·74, H 3·53, N 10·51 *(Abel* und *Davis)*.

Exakte Pigmentstudien über Federnpigmente von Vögeln liegen nicht vor *(Krukenberg)*.

Darstellung von Phymatorhusin (*Berdez* und *Nencki* [2]) aus melanotischen Geschwülsten des Menschen.

Das fein zerhackte melanotische Tumorgewebe wird ausgiebig mit heißem 93%igem Alkohol und dann mit Äther und der trockene Gewebsrückstand mit 1%iger Kalilauge im 4fachen Gewicht extrahiert. Die Extrakte werden abgegossen und die noch gefärbten Gewebsreste mehrfach wiederholt mit der Laugenlösung behandelt. Die filtrierten vereinigten Lösungen werden mit Salzsäure gefällt. Der flockig ausfallende Farbstoff wird abfiltriert und auf dem Wasserbad (nachdem er vorher vom Filter abgelöst ist) getrocknet. Dann folgt ein Extrahieren mit kalter 1%iger Kalilauge, erneutes Fällen, Auswaschen und Trocknen, und zur Beseitigung von Eiweißresten eine 2—3stündige Hydrolyse mit kochender 10%iger Salzsäure in 20facher Menge. Der ungelöste Rückstand wird dann säure- und chlorfrei gewaschen, mit Alkohol und Äther behandelt und bei 110° getrocknet. (Diese Methode ist auch für Chorioidealpigment und für Hippomelanin anwendbar.)

Darstellung von Pigment aus Melanosarkom *(Zumbusch, Wolff)* durch kombinierte Proteolyse und Sodaextraktion.

Wir geben die Methode von *Wolff* [3]) wieder, die im Prinzip einer älteren Methode von *Brandl* und *Pfeiffer* folgt. Gerade aus den folgenden

---

[1]) *J. Abel* und *W. S. Davis*, On the pigments of the negros skin and hair. Journ. of exp. Med. Vol. **1**. p. 361.

[2]) *Berdez* und *M. Nencki*, Über die Farbstoffe melanotischer Sarkome. Arch. f. exp. Pharm. u. Path. Bd. **20**. S. 346 (1886). — *M. Nencki* und *N. Sieber*, Weitere Beiträge zur Kenntnis der tierischen Melanine. Ibid. Bd. **24**. S. 17 (1887).

[3]) *H. Wolff*, Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **5**. S. 476 (1904). (Literatur!)

Daten geht hervor, wie weit die Anwendung von Alkalien (Soda oder Ätzkali) Veränderungen hervorruft. Andrerseits geht daraus auch hervor, daß genuine Melanine schon a priori eine verschiedene Alkaliresistenz besitzen, und daß die Verschiedenheit der Elementarzusammensetzung auch von der Methode unabhängig sein kann.

Die gut zerkleinerte Leber wird mit Pepsinsalzsäure bei Brutschranktemperatur behandelt; die Pepsinlösung wird so oft durch Dekantieren und Wiederzusatz neuer Lösung gewechselt, als noch Albumosen in Lösung nachweisbar sind. Der zuletzt mit Wasser gut gewaschene schwarze Rückstand wird solange mit 8%iger Sodalösung extrahiert, bis die Extrakte farblos ablaufen.

Aus den gesammelten Filtraten wird das Melanin mit Essigsäure gefällt und durch wiederholtes Lösen und Fällen gereinigt, zuletzt bei 110° getrocknet (Präparat A). In einem Fall kann nun die Gesamtheit des vorhandenen Pigmentes in Lösung gehen, in anderen Fällen bleibt ein beträchtlicher sodaunlöslicher Rückstand. Dieser wird mit 5%iger Natronlauge bei 50—60° gelöst und aus dem Filtrat dieses Extraktes mit Salzsäure (nicht fällbar durch Essigsäure) gefällt. Die Fällung wird nun durch Lösen in Sodalösung (in der dieser Körper jetzt wieder löslich geworden ist) und Fällen mit Essigsäure wie oben gereinigt (Präparat B).

Zusammensetzung von

A: C 48·68, H 6·00, Fe 2·63, S 2·51, N 9·75, Asche 3·24%
B: „ 50·59, „ 5·92, „ —, (Spur), „ 10·24, „ — %

Präparat eines Tumormelanins, dessen Acetat in Soda löslich war:

C 57·28, H 5·41, Fe —, S 1·67, N 9·34%.

Zusammenfassend sei hier noch einmal darauf hingewiesen, daß die Anwendung von Alkalien bei der Melanindarstellung (also z. B. bei Kombination der sub II und III genannten Methode) unbedingt zu veränderten Produkten führt. Die Einwirkung von Alkali durch Konzentration und Dauer entzieht sich jeder methodischen Kontrolle. Aber ebenso bedarf die Anwendung der ausschließlichen Säurehydrolyse nach *v. Fürth* und *Jerusalem* einiger Rücksicht. Bekanntlich entstehen aus Eiweißkörpern durch Säurehydrolyse schwarze Substanzen, sogenannte „Melanoidinsäuren", die je nach ihrer vorhandenen Menge amorph ausfallen oder im Hydrolysengemisch gelöst bleiben. Diese Körper gehen leicht als Säuren mit Alkalien (Ätzalkalien, starkes Ammoniak) in Lösung und verhalten sich dann wie Melaninsäuren selbst, die durch Alkali aus genuinen Pigmenten entstehen. Im Falle der Hippomelanindarstellung hat man diese Substanzen als Verunreinigung wenig zu befürchten, da sie leicht mit Alkali beseitigt werden können (sofern sie überhaupt amorph ausgefallen waren), während das Hippomelanin erst durch mehrstündige Behandlung mit der 6—10fachen Menge Ätzkali in Lösung geht. Hingegen ist es wohl denkbar, daß ein genuines Melanin weniger alkaliresistent sein könnte, so daß es mit den Melanoidinsäuren gemeinsam gelöst würde. Man wird in jedem Fall die Säurehydro-

lyse nur dann anwenden, wenn die vorhandene Eiweißmenge (wie in melanotischen Drüsen) im Vergleich zum Pigmentgehalt eine sehr geringe ist, so daß keine Gefahr vorliegt, daß die geringe Spur entstehender Melanoidine ungelöst ausfiele.

In allen anderen Fällen wird vorläufig eine Alkalibehandlung kaum zu umgehen sein. Nur dürfen in diesen Fällen Analysenresultate, besonders auch für Eisen- und Schwefelgehalt, nicht zu hoch bewertet werden.

Die Darstellung von Melaninen aus Geweben der niederen Tierwelt geschieht im Prinzip nach den eben genannten Methoden. Besondere Berücksichtigung bedarf nur noch die Darstellung und der Nachweis von Melanin und Melanogen aus pathologischem Harn.

Melanin und Melanogen in Harn. Man überzeuge sich zunächst im Falle eines dunkel entleerten oder beim Stehen nachdunkelnden Harns von der Abwesenheit einer Alkaptonurie (Reduktionsproben, Eisenchloridprobe, Isolierung der Homogentisinsäure). Zur Darstellung des echten Harnmelanins (bei Trägern melanotischer Tumoren beobachtet) fällt man den Farbstoff mit essigsaurem Blei. Der Bleiniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Der Rückstand des Filtrates von dem schwarzbraun gefärbten Bleisulfidniederschlag stellt das Melanin dar.

Einfacher ist eine Fällung des Harns mit Barytwasser. Der braungelb gefärbten Barytfällung wird der Farbstoff mit Sodalösung entzogen, aus der er mit Mineralsäuren ausgefällt wird. Wiederholtes Lösen und Fällen aus Lauge mit Säure führt zu reineren, aber keineswegs einheitlichen Produkten.

Bisweilen wird anstatt des Melanins dessen farbloses Chromogen ausgeschieden.

Nachweis. Man bewirkt eine Umsetzung in Melanin durch Zusatz eines oxydierenden Mittels (Eisenchlorid, Kaliumdichromat, Salpetersäure, Brom- oder Chlorwasser + Schwefelsäure unter Vermeidung eines Überschusses). Ein Überschuß des stärker wirksamen Chlor- oder Bromwassers führt zur Bildung eines schmutziggelben Niederschlages.

V. Sonstige Farbstoffe zum Teil unbekannter Natur.

Wir beschließen das Kapitel mit einer kurzen Besprechung der mannigfaltigen „sonstigen" tierischen Farbstoffe, bei denen sogar die Versuche einer Gruppenzuweisung nach chemischen Gesichtspunkten bisher nur willkürlich oder gar nicht gelungen sind. Für ihre Systematik bleibt daher nur die Einteilung nach den ihnen eigenen Grundfarben übrig. Daß hierbei vollständig heterogene Substanzen vereinigt werden, ist unzweifelhaft. Bei der Darstellung dieser Körper müssen ganz besonders die im allgemeinen Teil eingangs erwähnten Anweisungen und methodischen Rücksichten beachtet werden. Eine detaillierte Beschreibung der Eigenschaften dieser Körper findet sich bei *v. Fürth* (siehe S. 717, Note 1). Nur für einzelne dieser Substanzen sind genauere methodische Details hier am Platze. Die Mehrzahl dieser Substanzen findet sich bei niederen Tieren.

1. Sogenannte Uranidine bilden eine Gruppe, die rein willkürlich und durch wenige Klassenmerkmale charakterisiert und abgegrenzt ist (*Krukenberg*[1]):

Gelbe Farbstoffe, die auf Alkalizusatz eine grün oder blaugrüne Fluoreszenz annehmen und sich unter dem Einfluß von Licht oder Sauerstoff leicht zu dunkel gefärbten Produkten umbilden, werden als Uranidine bezeichnet. Die Labilität dieser Körper, auch schon gegen Alkohol, Alkalien oder Wärme ist eine so große, daß eine chemische Charakterisierung bis jetzt nicht möglich ist. Die frischen Lösungen zeigen keine Absorptionsstreifen.

Methodisches läßt sich über diese Substanzen wenig berichten. Man schließt auf die Existenz dieser Körper, wenn entweder das gefärbte Gewebe oder Extrakte mit neutralem, besser saurem Alkohol oder Chloroform, Äther oder Benzol an der Luft oder nach Erwärmen den obengenannten Farbenwechsel durchmachen.

Am stabilsten sind noch Extrakte mit schwach saurem Alkohol (für Holothurien), aus denen Ammoniak das gelblich gefärbte Pigment ausflockt.

Solche Körper fanden sich bei Aplysien, Korallen, Holothurien- und Arenicolaarten.

2. Gelbe Farbstoffe. Bei der Untersuchung solcher Substanzen ist vor allem eine Zugehörigkeit zu Lipochromen auszuschließen, die z. B. für das sogenannte Äthalioflavin aus Aethalium septicum (Protozoon) und das Aplysiofulvin mancher Aplysienarten (Spongien) gelungen ist.

3. Rote Farbstoffe, die bei niederen Tieren weit verbreitet sind, sind zum größeren Teil in Wasser löslich und daher frei von anderen Pigmenten (Lipochromen) darstellbar. Man zerkleinert das fragliche Organsubstrat, bringt Eiweißkörper durch Erhitzen zur Unlöslichkeit, trocknet und extrahiert mit kaltem oder leicht vorgewärmtem Wasser. Nach dieser Art sind mehrere besser charakterisierte Farbstoffe gewonnen, u. a. die sogenannten Floridine aus Spongien und Korallen (*Krukenberg*[2]).

Für die Floridine ist der Farbenwechsel in Grünblau und die Fällbarkeit durch Ammoniak sowie das Bleichen beim Erwärmen der violett bis grün fluoreszierenden Lösungen charakteristisch. Den Floridinen fehlen die für Hämatinderivate typischen Absorptionsstreifen.

Gleichfalls wasserlöslich ist der als Antedonin bezeichnete rote Farbstoff der Haarsterne. Im Gegensatz zu den Floridinen weist eine Lösung des roten Antedonins 3 Absorptionsstreifen zwischen D und F auf. Nach Säurezusatz verändert sich mit einem gleichzeitigen Farbenumschlag in Orange das Spektralbild. Es finden sich nur 2 Bänder um E und F. Ammoniak fällt aus wässeriger Lösung einen Körper, der trocken ein violettes Pulver darstellt. Eine Analyse der Antedonine liegt nicht vor.

---

[1]) *R. Krukenberg,* Die Pigmente. Vergleichend-physiologische Studien. I. Reihe. Abt. 3. S. 111. II. Reihe. Abt. 3. S. 41. Abt. 4. S. 172. Abt. 2. S. 53.

[2]) *R. Krukenberg,* Ibid. II. Reihe. Abt. 3. S. 36 (1882).

In ammoniakalischem Wasser löslich erwies sich ein Actiniochrom und Purpuridin mancher Actinien, in saurem Alkohol löslich ist ein Pentacrinin zahlreicher Tiefseepentacrinusarten. Die mehr violetten bis blauvioletten Farbstoffe der Echinidienarten hinwieder werden von verdünnter Säure aufgenommen. Das violette Pelagein der Medusa pelagia geht in organische Lösungsmittel (Alkohol, Äther, Eisessig, besonders Schwefelkohlenstoff) über (*Griffiths* und *Platt*[1]). Manche rote Farbstoffe in Tegumenten oder Schalen von Molluskenarten sind erst nach Aufschluß der Gehäuse mit Säuren in Alkohol, Äther oder Chloroform löslich.

Im einzelnen sind für Identifikationen die Absorptionsspektren der Farbstofflösungen zu studieren:

Das Actinochrom (*Mosely*[2]), *Mac Munn*[3]) zeigt ein dem Hämatin ähnliches Spektrum, doch liegt ein Band dem Violett näher.

Purpuridin weist keine Streifen auf. Pentacrinin (*Mosely*[4]) zeigt 3 Streifen, und zwar zwischen D und E und zwischen b und F. Durch Ammoniakzusatz erfolgt ein Umschlag in Blaugrün und das Verschwinden der Absorptionsstreifen bis auf ein Band vor B.

Weit verbreitet sind rote Farbstoffe bei Insekten.

Cochenillefarbstoff. Karminsäure aus Coccus cacti wird nach *Schunk* und *Marchlewski*[5]) rein dargestellt.

Die käufliche, aus den flügellosen Weibchen des Insekts bestehende Cochenille wird fein gepulvert und mit kochendem Wasser extrahiert. Die filtrierte Lösung wird mit Bleiacetat gefällt, wodurch der Farbstoff niedergeschlagen wird. Der feuchte Bleisalzniederschlag wird in absolutem Alkohol fein zerteilt und durch tropfenweisen Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure in Lösung gebracht. Die durch Filtration von Bleisulfat getrennte, gelbrote Lösung wird bei niederer Temperatur am schnellsten im Vakuum zur Trockene gedampft. Den Trockenrückstand löst man in kaltem absolutem Alkohol. Aus dieser Lösung wird der tiefrote Farbstoff mit dem mehrfachen Volumen Äther, Benzol oder Chloroform gefällt und auf dem Filter mit dem Fällungsmittel gewaschen. Zur Darstellung von Kristallen überläßt man eine alkoholische oder stark essigsaure Lösung der langsamen Verdunstung im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure.

Der Säure kommt wahrscheinlich die Formel $C_{17}H_{18}O_{10}$ zu, sie dürfte ein Hydrindenderivat sein.

[1]) *A. B. Griffiths* und *Platt*, Sur la composition de la Pélageine. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. T. **121**. p. 451 (1895); Journ. Am. Chem. Soc. Vol. **17**. p. 877.

[2]) *H. N. Moseley*, On Actiniochrom a colouring matter of Actinias which gives an Absorptionsspectrum. Quart. Journ. Micr. Science. Vol. **13**. p. 143 (1873).

[3]) *C. A. Mac Munn*, Observations on the chromatology of Actiniae. Proc. Roy. Soc. Vol. **38**. p. 86 (1885); Philos. Transactions. Vol. **176**. p. 641 (1885).

[4]) *H. N. Moseley*, On the colouring matters of various animals. Quart. Journ. Micr. Science. Vol. **17**. p. 5 (1877).

[5]) *E. Schunk* und *L. Marchlewski*, Zur Kenntnis der Karminsäure. Chem. Ber. Bd. **26**. S. 2647 (1893); Bd. **30**. S. 1759; u. a. vgl. hierzu: *O. Dimroth*, Zur Kenntnis der Karminsäure. Chem. Berichte. Bd. **42**. S. 1611 (1909).

Die alkoholische Lösung zeigt drei unscharf begrenzte Absorptionsstreifen, einer in Grün, zwei in Blau.

Roter Farbstoff der Kermesschildlaus (Lecanium ilicis). Die Methode der Darstellung sei hier mitgeteilt, da sie möglicherweise generelle Anwendung für andere Farbstoffe finden kann.

Die gepulverten und getrockneten Insekten werden durch Ätherextraktion von Fetten befreit und dann mit schwefelsäurehaltigem Alkohol extrahiert. Zu der alkoholischen Lösung setzt man Äther und soviel Wasser, daß es zu einer Äthertrennung kommt, wobei der Farbstoff in die ätherische Schicht übergeht. Die abgetrennte Ätherlösung wird mit Wasser gewaschen und dann mit einer wässerigen Lösung von Natriumacetat ausgeschüttelt. Die abgetrennte Acetatlösung, die violettrot gefärbt ist, wird mit Schwefelsäure zersetzt, wobei sich aus der nun ziegelroten Lösung nach einiger Zeit ein kristallinischer oder flockiger Farbstoffniederschlag abscheidet. Die Fällung wird gesammelt und aus säurehaltigem Wasser umkristallisiert (*Heise*[1]).

Der Farbstoff ist von Karminsäure leicht unterscheidbar, da er in Äther und Amylalkohol leicht löslich ist. Auch der Farbenumschlag in Violett mit schnell folgendem Abblassen durch Alkali, die schwarze Fällung mit Eisenacetat, die violette mit Bleiacetat und die rotviolette mit Kupfersulfat sind recht charakteristisch.

Rote, purpurrote Farbstoffe finden sich auch bei Warmblütern und Vertebraten.

Sehpurpur der Retina.[2]) Die möglichst frischen Netzhäute werden mit einer alkoholfreien wässerigen und schwach alkalisch reagierenden Lösung von gallensaurem Natron extrahiert. Aus dieser Lösung fällt man den Farbstoff mitsamt den Cholaten als harzige Masse mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung. Diese blutfarbstofffreie Masse wird abgetrennt, in Wasser gelöst und durch Dialyse von gallensauren Salzen befreit. Hierbei fällt der Farbstoff flockig aus. Er ist dann in Wasser mit Purpurfarbe wieder löslich, aber gegen Luft, Wärme, saure Alkalien, auch gegen organische Solventien sehr empfindlich. Dabei geht eine Entfärbung über Rot, Orange und Gelb vor sich.

4. Blaue Farbstoffe.

Auch diese bis jetzt studierten Farbstoffe sind zumeist wasserlöslich und daher den sie enthaltenden Geweben leicht extrahierbar.

Unter ihnen sind besonders das Cyanein aus dem Schirm blauer Medusen (Rhizostoma u. a.), der Farbstoff in den Flossen von Crenilabrus pavo und das Hämocyanin des Cephalopodenblutes genauer studiert. Diese Körper erwiesen sich ihrem Verhalten nach als Eiweißkörper sui generis, die aber keinen etwa dem Hämoglobin ähnlichen Aufbau aus einer globin-

[1]) *R. Heise*, Zur Kenntnis des Kermesbeeren- und Kermesschildlausfarbstoffes. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. **11**. S. 513 (1895).

[2]) *W. Kühne*, Zur Darstellung des Sehpurpurs. Zeitschr. f. Biol. Bd. 32. S. 21 (1895).

ähnlichen Eiweißkomponente und einer organischen metallhaltigen Chromogenkomponente besitzen. Das Hämocyanin ist bereits S. 724 ff. erwähnt.

Darstellungsmethoden. Cyanein. Man verarbeitet die periphere Zone des blauen Medusenschirms, den man etwa in einer Breite von 5 *mm* abschneidet. Die Gewebsstücke legt man in destilliertes Wasser, wodurch das Gewebe zum Absterben kommt und der freie, vorher körnig abgelagerte Farbstoff in Lösung geht.

Die Lösung ist durch eine Fluoreszenz nach dem Rot und durch drei Absorptionsstreifen ausgezeichnet. Einer im Orangegelb zwischen C und D, einer im Gelbgrün hinter D und einer im Grünblau.

Durch Alkalien ist ein farbloses amorphes Pulver fällbar, das sich in Säuren wieder mit roter Farbe löst. Die wässerige primitive Lösung wird durch Säuren gleichfalls rot. Ein Schwermetall (Cu) findet sich nicht in Lösung.

Der blaue Farbstoff von Crenilabrus pavo (*Zeyneck*[1]) findet sich neben anderen roten und gelben Pigmenten im Schuppenkleid dieses Fisches.

Man befreit die blau gefärbten Partien von Schleim durch Abschwemmen mit Wasser und extrahiert dann ergiebig mit Aceton, wodurch ein roter Farbstoff in Lösung geht. Dann läßt man eine Waschung mit trockenem Äther folgen. Nach dieser Vorbehandlung geht der blaue Farbstoff mit destilliertem Wasser in Lösung. Die reinsten Lösungen lassen sich aus den Flossen gewinnen, wenn man die Wasserextraktion nicht allzu lange fortsetzt. Eine Darstellung gelingt dann durch Fällung der wässerigen Lösung des Farbstoffes mit 10—15%igem Am_2SO_4, Sammeln und Lösen des Niederschlages, Reinigen durch mehrtägige Dialyse und Einengen der wässerigen Lösung.

Der gewiß noch nicht rein dargestellte Körper scheint ein Eiweißkörper zu sein. Er erwies sich als metallfrei.

Über Cyanokristallin siehe S. 760.

5. Grüne Farbstoffe.

Auch hier gilt das im allgemeinen Teile besprochene Prinzip, zu einer Darstellung oder einer Isolierung das geeignete Lösungsmittel zu wählen.

So kann das Bonellein aus Bonellia viridis (Klasse der Würmer) mit Alkohol oder Äther entzogen werden. Wasserzusatz fällt aus salzsaurem Alkohol einen grünen Flockenniederschlag (*Gottlieb Schunk*[2], *Sorby*[3]). Der Körper zeigt ein charakteristisches spektroskopisches Verhalten. 4 Bänder (zwischen C und D, bei D, zwischen E und b und zwischen E und F),

[1]) *R. v. Zeyneck*, Über den blauen Farbstoff aus den Flossen von Crenilabrus Pavo. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **34**. S. 148 (1901); ibid. Bd. **36**. S. 568 (1902).

[2]) *Schunk*, Der grüne Farbstoff von Bonellia viridis. Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wissensch. Math.-nat. Kl. Bd. **72**. II. S. 581 (1875).

[3]) *Sorby*, On the colouring matter of Bonellia viridis. Quart. Journ. Micr. Science. Vol. **15**. p. 166 (1875).

deren Lage aber von jenen einer Chlorophyllösung verschieden ist. Auch das stabile Verhalten in alkoholischer Lösung gegen Säuren (Purpurfärbung) und Alkalien (Rückbildung des ursprünglich grünen Farbstoffes) unterscheidet von Chlorophyll.

Gleichfalls in Alkohol löslich ist der grüne Farbstoff Chätopterin (*Ray-Lancester*[1]) aus Chaetopterus. Er zeigt vier anders gelegene Absorptionsstreifen und wird auf Säure indigoblau, nach Alkalizusatz zitronengelb. Ein grünes Pigment aus Phyllodoce viridis zeigt in Alkohol keine Absorptionsstreifen und wird durch Säure braungelb, durch Ammoniak schön rot.

Andere grüne Farbstoffe sind in verdünnten Säuren löslich und durch Alkalizusatz unter Purpurfärbung fällbar (aus Aedosoma tenebrarium, Klasse der Oligochäten).

Auf die Frage nach der Darstellung und den Nachweis von tierischem Chlorophyll kann hier nicht eingegangen werden. Es sei nur hervorgehoben, daß die Identifikation als echtes Chlorophyll nur durch die exakteste spektroskopische Beobachtung und Analyse gestattet ist (*Engelmann*) oder die direkte Bestimmung einer Sauerstoffausscheidung und eines Kohlensäureverbrauchs, und daß daneben der sichere zoologische Nachweis erbracht werden muß, daß der fragliche Körper nicht ein von außen eingeführtes und etwa umgeformtes Chlorophyll, sondern ein selbstgebildetes Chlorophyll darstellt (vgl. hierzu die Derivate des Chlorophylls und Hämoglobins und die chemischen Beziehungen beider).

---

[1]) *Ray-Lancester*, On the green Pigment of the intestinal wall of the Annelid Chaetopterus. Quart. Journ. Micr. Science. Vol. 40. p. 447 (1898).

Darstellung und Eigenschaften der für das Nervengewebe charakteristischen Lipoide.

Von **W. Cramer** (Edinburgh).

Einleitung.

Die Lipoidsubstanzen des Gehirns lassen sich in 3 Gruppen trennen: die phosphorfreien stickstoffhaltigen Galaktoside, die sog. „Cerebroside", die stickstoffhaltigen Derivate der Glycerophosphorsäure, die „Phosphatide" und das Protagon, welches die einzige bisher bekannte schwefelhaltige Lipoidsubstanz ist und sich in Cerebroside und Phosphatide spalten läßt. Die Einteilung des folgenden Kapitels ist dementsprechend erfolgt.

Widerspruchsvolle Angaben sind im Gebiete der Gehirnchemie leider besonders häufig. Dies rührt zum Teil davon her, daß verschiedene Autoren verschiedene Substanzen, die auf verschiedene Weise erhalten wurden, oft mit dem gleichen Namen belegt haben. Es hat sich daher für die Behandlung dieses Gegenstandes als zweckmäßig erwiesen, die von verschiedenen Autoren dargestellten Substanzen, wenn nötig, getrennt zu behandeln, ohne auf die ihnen beigelegten Namen Rücksicht zu nehmen. Die Identifikation verschiedener Präparate ist nach streng chemischen Gesichtspunkten erfolgt, d. h. durch Vergleichung der Analysenzahlen und physikalischen Konstanten. Es ist nötig, dies hier besonders hervorzuheben, da diese Gesichtspunkte oft zugunsten oberflächlicher Ähnlichkeiten im Aussehen oder in der Darstellungsmethode vernachlässigt worden sind, was zu groben Irrtümern Anlaß gegeben hat.

Material.

Zu den meisten Untersuchungen sind Schafsgehirne oder Rindergehirne verwendet worden. Die aus diesem Material erhaltenen Produkte scheinen identisch zu sein. In einzelnen Fällen ist auch menschliches Material zur Verwendung gekommen, wobei geringe Unterschiede aufgefunden worden sind. So soll z. B. das aus Menschengehirn dargestellte Cerebron einen anderen Schmelzpunkt haben als das aus Schafsgehirnen erhaltene Cerebrin *(Koch)* und das aus Menschengehirn dargestellte Protagon soll

etwas mehr Schwefel enthalten. Wenn man jedoch bedenkt, daß die von verschiedenen Autoren aus dem gleichen Material erhaltenen Produkte ebenso große Unterschiede aufweisen und daß die aus dem Menschengehirn dargestellten Substanzen noch dazu mittelst anderer Methoden erhalten werden, so kann man den beobachteten Verschiedenheiten vorläufig keine Bedeutung zumessen. Der Unterschied im Schmelzpunkt des Cerebrins aus Schafshirn (nach *Koch*) und des Cerebrons aus Menschengehirn (nach *Thierfelder*) ist jedenfalls nicht so zu deuten, daß hier verschiedene Substanzen vorliegen, da das von *Gamgee* aus Rindergehirn isolierte Cerebron denselben Schmelzpunkt hatte, wie das von *Thierfelder* aus menschlichem Material erhaltene.

Entwässerung des Materials.

Da die für das Nervensystem charakteristischen Substanzen in Wasser unlöslich sind und durch Extraktion mit kaltem oder heißem Alkohol oder Äther gewonnen werden müssen, so ist es zweckmäßig, das Wasser zuerst zu entfernen. Dabei dürfen jedoch physiologische Temperaturen nicht überschritten werden.

Zur Entfernung des Wassers sind eine Reihe von Methoden verwendet worden. Handelt es sich um sämtliche sowohl in kaltem wie heißem Äther und Alkohol lösliche Gehirnbestandteile, so kann man das Verfahren von *Baumstark* oder das schnellere Verfahren von *Erlandsen* anwenden. Das Wesentliche dieser Methoden besteht darin, daß zuerst mit Äther und dann erst mit Alkohol extrahiert wird. Die durch Alkoholextraktion hervorgerufene Abspaltung ätherlöslicher Substanzen wird dadurch ausgeschaltet.

Nach *Baumstark*.[1])

Das frische Gehirn wird in engmaschiger Gaze möglichst unversehrt in eine weithalsige Stöpselflasche (oder Exsiccator), die etwa $^1/_8$ ihres Volumens Äther enthält, gehängt oder auf einen durchlöcherten Einsatzboden gelegt. War das Gehirn frisch, so tropft eine bluthaltige, wässerige Lösung rasch aus dem Gehirn ab. Der Äther wird ab und zu erneuert. Ist alles Blut abgeflossen, so wird das Gehirn von der äußeren Haut befreit und in größere Stücke zerschnitten und die in Gaze gewickelten Stücke in Äther gelegt, so daß derselbe 1—2 *cm* über der Gehirnmasse steht. Der Einsatzboden soll ungefähr 5 *cm* hoch sein, so daß das Gewebe über der abfließenden wässerigen Lösung liegt. Die wässerige Lösung wird alle 8, später alle 14 Tage abgehebert und der Äther frisch aufgefüllt. Die Entwässerung ist nach 2—3 Monaten vollendet. Durch Anwendung verminderten Druckes wird die Diffusion beschleunigt. Die Gehirnstücke werden in flache Scheiben geschnitten. Die Ätherextraktion wird dann mit mehr Äther 2 Monate lang fortgesetzt. Der Äther wird alle 8—14 Tage erneuert.

Dann wird die Gehirnmasse in 80%igen Alkohol gebracht. Nach 24 Stunden wird die anhaftende Flüssigkeit gelinde abgepreßt, ohne das

[1]) *F. Baumstark*, Über eine neue Methode, das Gehirn chemisch zu erforschen und deren bisherige Ergebnisse. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **9**. S. 158 (1885).

Gewebe zu zerquetschen. Dann wird zweimal mit 95⁰/₀igem Alkohol extrahiert, unter kräftigem Druck der Alkohol entfernt, wobei man einen trockenen, zähen, faserigen Preßkuchen erhält, der zerkleinert mit absolutem Alkohol einige Tage lang extrahiert wird.

Der Alkohol wird abgegossen, der Rückstand ausgebreitet und an der Luft getrocknet. Es muß dann eine graue, trockene, leicht pulverisierbare, nicht hygroskopische Substanz zurückbleiben, die sich längere Zeit aufbewahren läßt.

Diese Methode ist sehr langwierig und umständlich. Sie ist jedoch besonders wertvoll, wenn man die in irgend einem Organ vorgebildet vorhandenen wasserlöslichen Substanzen untersuchen und daher jegliche Zersetzung durch Manipulation oder Extraktion ausschließen will. Diese Substanzen finden sich dann nämlich in der unter dem Äther sich sammelnden wässerigen Flüssigkeit. Zu diesem Zwecke ist diese Methode zuerst für das Gehirn verwendet worden[1], ist jedoch in gleicher Weise für andere Organe anwendbar.

Schneller kommt man zum Ziel, wenn man[2] das zerkleinerte Gewebe in dünnen Schichten auf geneigten Glasplatten ausbreitet und mittelst eines Ventilators einen kräftigen Luftstrom darüber leitet. Durch leichte Erwärmung des Raumes und wiederholte Wendung des Materiales wird die Austrocknung beschleunigt, so daß die Hauptmenge des Wassers innerhalb 12 Stunden abgegeben wird. Die dann hinterbleibende zusammenhängende Masse wird in kleine Stückchen geschnitten, in einen Gazebeutel gebracht und in einem auf 40° erwärmten Vakuumkasten aufgehängt. Durch den evakuierten Wärmekasten, in welchem Schalen mit Chlorcalcium aufgestellt sind, wird ein Strom trockener Luft gesaugt. Nach 4—6 Stunden kann das Material zu einem feinen Pulver zerrieben werden, welches sogleich noch einmal der Vakuumtrocknung unterworfen wird, so daß schließlich ein feines, leicht stäubendes Pulver erhalten wird, das hygroskopisch ist und an der Luft sich leicht oxydiert. Es muß daher im Vakuum über Schwefelsäure aufbewahrt werden, falls es nicht sofort der Extraktion durch Äther unterworfen wird.

Eine sehr rasche und einfache Vorbereitungsmethode besteht darin, daß man das zerkleinerte Gewebe mit ungefähr der anderthalbfachen Menge wasserfreien Natriumsulfats verreibt und durch ein Sieb reibt. Man erhält so ein trockenes Pulver, das sofort der Extraktion mit Äther oder, falls das Cholesterin zuerst entfernt werden soll, mit Azeton unterworfen werden kann. Diese Methode ist bisher nur zur Darstellung von Cholesterin[3]

---

[1]) *S. Vincent* and *W. Cramer*, The nature of the physiologically active substances in extracts of nervous tissues and blood with some remarks on the methods of testing for choline. Journ. of Physiol. Vol. **30**. p. 151 (1904).

[2]) *A. Erlandsen*, Untersuchungen über die lezithinartigen Substanzen des Myocardiums und der quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **51**. S. 70 (1907).

[3]) *R. Bünz*, Über das Vorkommen von Cholesterinestern im Gehirn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **46**. S. 48 (1905).

und Protagon[1]) (siehe unten) verwendet worden. Ob sie sich zur Darstellung der Phosphatide eignet, ist noch nicht festgestellt worden.

Hat man größere Gewebemengen zu verarbeiten, so hat diese Methode den Nachteil, daß das Volumen des zu verarbeitenden Materiales zu große Dimensionen annimmt.

Protagon.

Allgemeines.

Es ist hier nicht der Ort, auf die Streitfrage, ob das Protagon eine Verbindung von Phosphatiden und Cerebrosiden ist, oder ob es ein Gemenge dieser Substanzen darstellt, einzutreten. Für den Zweck des vorliegenden Werkes genügt es festzustellen, daß reines Protagon eine Substanz von ganz konstanter Zusammensetzung ist, sich beliebig oft unverändert umkristallisieren läßt, und durch seine chemischen und physikalischen Eigenschaften ebenso scharf charakterisiert ist als irgend eine aus dem Nervengewebe oder aus irgend einem anderen Gewebe isolierte Substanz. Daß neben dem Protagon noch andere phosphorhaltige Lipoide im Nervengewebe vorkommen, ist bereits von *Gamgee, Kossel* und *Freytag, Noll* u. a. erkannt worden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben über Präparate, die mit dem Protagon im Aussehen oder in der Darstellungsweise eine oberflächliche Ähnlichkeit haben, aber sich vom Protagon in ihren chemischen oder physikalischen Eigenschaften scharf unterscheiden. Da diese Substanzen, welche entweder ein stark verunreinigtes oder zersetztes Protagon darstellen, fälschlicherweise[2]) für Protagon gehalten worden sind, so finden sich in der Literatur die widerspruchsvollsten Angaben über Protagon und es ist der Anschein erweckt worden, als ob diese Substanz eine ganz veränderliche, unbestimmte Mischung darstellt. Die Angaben über solche Präparate sind im folgenden nicht berücksichtigt worden. Die unten gegebenen Eigenschaften beruhen im wesentlichen auf Angaben von *Gamgee* und auf eigenen Beobachtungen.

Darstellung. Bei der Darstellung des Protagons ist besonders darauf zu achten, daß eine längere Behandlung mit warmem (45°) oder heißem Alkohol vermieden wird, da dadurch Zersetzung herbeigeführt wird, wie neuerdings auf einwandfreie Weise durch Bestimmung der physikalischen Konstanten nachgewiesen worden ist.[3]) Dabei spaltet sich das Protagon in

---

[1]) *Lochhead* and *W. Cramer*, On the phosphorus percentage of various samples of protagon. Biochemical Journ. Vol. 2. p. 350 (1907).

[2]) Dieser Irrtum beruht zum Teil darauf, daß die aus dem reinen alkoholischen Extrakt beim Erkalten ausfallende Substanz schlechtweg als Protagon bezeichnet worden ist, während es in Wirklichkeit nur ein Rohprodukt darstellt, welches neben Protagon andere Phosphatide und Cerebroside enthält und aus welchem durch weitere Bearbeitung reines Protagon gewonnen werden kann.

[3]) *Wilson* and *Cramer*, On Protagon: its chemical composition and physical constants, its behaviour towards alcohol and its individuality. Quart. Journ. of Experimental Physiology. Vol. 1. p. 97 (1908).

eine phosphorreichere, in kaltem Alkohol leichter lösliche Substanz und in eine phosphorarme, schwerer lösliche Substanz (oder Substanzen).[1] Eine Zersetzung eines Teiles des Protagons läßt sich wahrscheinlich bei keiner der unten angegebenen Methoden ganz vermeiden, so daß keine derselben zu den quantitativen Methoden gerechnet werden kann.

Nach *Wilson* und *Cramer*.[2] Diese Methode ist die einfachste und sicherste Methode zur Darstellung des Protagons. Das von Blut und den Gehirnhäuten möglichst befreite und zerkleinerte Gehirn wird in einer weithalsigen Flasche mit 90—96%igem Alkohol bei möglichst niedriger Temperatur extrahiert. Die Extraktion wird durch Schütteln beschleunigt. Nach dem Absetzen und Dekantieren des Alkohols wird die Extraktion mit frischem Alkohol 3—4mal wiederholt. Die Masse wird durch Filtrieren vom Alkohol befreit und die Extraktion zuerst mit einer Mischung von gleichen Teilen Alkohol und Äther, dann mit Äther allein bis zur völligen Erschöpfung fortgesetzt, was ungefähr 3—4 Extraktionen in Anspruch nimmt.

Nach dem Abfiltrieren des Äthers wird die Masse ausgebreitet und an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet. Bei richtiger Behandlung läßt sich die zurückbleibende braune Masse leicht in ein feines, trockenes graues Pulver zerreiben. Fühlt sich die zurückbleibende Masse fettig an und läßt sich dieselbe nicht leicht pulverisieren, so ist es besser, das Material zu verwerfen.

Aus dem Pulver kann dann entweder durch Extraktion mit warmem Alkohol, wie bei *Gamgees* Methode (siehe unten), oder mit kochendem Alkohol das Protagon gewonnen werden. Im letzteren Falle wird der vorher zum Sieden gebrachte Alkohol auf das Pulver gegossen, die Mischung im Wasserbade unter Umschütteln 1—2 Minuten lang erhitzt und die heiße alkoholische Lösung durch einen Heißwassertrichter in ein durch Eis gekühltes Becherglas abfiltriert. Die Extraktion mit kochendem Alkohol wird in der gleichen Weise noch zweimal wiederholt. Das aus der alkoholischen Lösung ausfallende Rohprodukt, welches Cerebron und Protagon enthält, wird mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Zur Reinigung wird das Rohprodukt aus einer geringen Menge kochenden absoluten Alkohols wiederholt umkristallisiert. Auch hier wird der vorher zum Sieden erhitzte Alkohol auf die Substanz gegossen und die heiße Lösung, wie oben beschrieben, schnell abfiltriert. Bei der ersten Umkristallisation bleiben beträchtliche Mengen einer gelblich-weißen, in kochendem Alkohol schwer löslichen Substanz zurück. Auch bei der zweiten Umkristallisation bleiben oft geringe Mengen dieser Substanz zurück. Beim dritten Mal löst sich jedoch in der Regel bei richtigem Arbeiten das Protagon leicht und ohne einen Rückstand zu hinterlassen, in einer geringen

---

[1]) *Chittenden* and *Frissel*, Proceed. Amer. Phys. Science. Vol. 5. pag. 901 (1897). *E. R. Posner* and *W. Gies*, Is Protagon a mechanical mixture of substances or a definite chemical compound? Journ. of biolog. chemistry. Vol. 1. p. 59 (1905).

[2]) *Wilson* and *Cramer*, On Protagon: its chemical composition and physical constants, its behaviour towards alcohol and its individuality. Quart. Journ. of Experimental Physiology. Vol. 1. p. 97 (1908).

Menge kochendem Alkohol auf. Die dann auskristallisierende Substanz, welche zweckmäßig zum schnelleren Trocknen mit kaltem Äther gewaschen wird, ist ein reines Produkt, welches durch weiteres Umkristallisieren nicht weiter in seiner Zusammensetzung verändert wird. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß auch beim Umkristallisieren eine längere Behandlung mit heißem Alkohol zu vermeiden ist, da sonst Zersetzung eintritt und ein vorher reines Präparat wieder Cerebron enthält.

Diese Methode ist besonders dann zu empfehlen, wenn man größere Organmengen zu verarbeiten hat (10—20 oder mehr Gehirne), da sich bei der Vorbehandlung mit Alkohol und Äther das Volumen stark vermindert. Hat man kleinere Organmengen zu verarbeiten, so kommt man schneller zum Ziel, wenn man das zerkleinerte Gewebe mit so viel wasserfreiem Natriumsulfat verreibt[1]), daß ein trockenes Pulver erhalten wird, welches dann mit kaltem Äther bis zur völligen Extraktion von Lezithin und Cholesterin etc. erschöpft wird. Aus dem Rückstand wird dann durch kochenden Alkohol in der oben angegebenen Weise das Protagon ausgezogen und durch Umkristallisieren gereinigt.

Gamgees Methode.[2]) Bei dieser Methode, welche bisher fast ausschließlich zur Darstellung des Protagons in Anwendung gekommen ist, wird die zerkleinerte Gehirnmasse mit warmem 85%igem Alkohol bei 45° mehrere Stunden lang digeriert. Die alkoholische Lösung wird abfiltriert und das Filtrat abgekühlt; der Rückstand wird wiederum ein- oder zweimal mit warmem Alkohol extrahiert. Die beim Abkühlen ausfallende Substanz wird durch wiederholtes Waschen mit Äther von Cholesterin, Lezithin etc. befreit. Der Rückstand wird durch wiederholtes Umkristallisieren aus warmem Alkohol bei 45° gereinigt.

Diese Methode beruht auf der Annahme, daß bei 45° eine Zersetzung des Protagons vermieden werden kann. Dies ist jedoch nicht der Fall, so daß auch bei dieser Methode die Behandlung mit warmem Alkohol so viel als möglich abgekürzt werden muß. Es ist überhaupt zweckmäßiger, diese Methode so zu modifizieren, daß das Wasser und die in kaltem Alkohol und Äther löslichen Substanzen zuerst entfernt werden, wie oben für die *Wilson-Cramer*sche Methode angegeben ist. Das so erhaltene trockene Pulver wird dann durch einmalige Behandlung mit warmem Alkohol, der auf 45° erwärmt worden ist, ausgezogen. Das beim Abkühlen auskristallisierende Rohprodukt wird in warmem Alkohol gelöst und auf diese Weise 2—3mal umkristallisiert.

Eine von *Cramer*[3]) ausgearbeitete Methode besteht darin, die zerkleinerte Gehirnmasse mit einer konzentrierten Natriumsulfatlösung zu er-

[1]) *Lochhead* and *Cramer*, The phosphorus percentage of various samples of protagon. Biochemical Journ. Vol. 2. p. 353 (1907).

[2]) *Gamgee* und *Blankenhorn*, Über Protagon. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 3. S. 260 (1879). — *Gamgee*, Textbook on the Physiological Chemistry of the animal body. London 1880. p. 427.

[3]) *Cramer*, On protagon, choline and neurine. Journ. of Physiology. Vol. 31. p. 36 (1904).

hitzen. Die geronnene Masse wird mit kochendem Alkohol ausgezogen und das so gewonnene Rohprodukt weiter, wie oben angegeben, verarbeitet. Diese Methode bietet jedoch praktisch keine Vorteile dar.

Die Verwendbarkeit verschiedener Lösungsmittel (Methylalkohol, Chloroform) ist vom Verfasser untersucht worden. Der Äthylalkohol scheint jedoch die besten Ausbeuten zu geben. Die Angabe, daß Protagon einfach durch mehrstündige Extraktion mit kochendem Azeton erhalten werden kann, ist unrichtig. Die so erhaltenen Produkte sind mit Protagon nicht identisch, was schon daraus hervorgeht, daß reines Protagon in kochendem Azeton nur wenig löslich ist.

Eigenschaften. Protagon ist in den meisten Lösungsmitteln in der Kälte sehr schwer löslich. Bei 30° löst es sich schon ziemlich leicht in Pyridin und in einer Mischung von 3 Teilen Chloroform und 1 Teil Methylalkohol. Es ist leicht löslich in heißem Methyl- und Äthylalkohol, Chloroform, Eisessig, kaum löslich in kochendem Äther und Azeton. In cholesterinhaltigem und kephalinhaltigem Äther soll es löslich sein. Diese Angabe bedarf jedoch noch der Bestätigung, da die in einer solchen Lösung vorhandenen und als Protagon angesprochenen Substanzen niemals genau untersucht worden sind. Es läßt sich am besten aus warmem oder kochendem Äthylalkohol umkristallisieren, aus welchem es sich beim langsamen Abkühlen in zu Rosetten vereinigten Nadeln, bei schnellem Abkühlen in amorphem Zustande ausscheidet. Durch längeres Erwärmen mit Alkohol wird es langsam zersetzt. Nach dem Trocknen ist es ein weißes, nicht hygroskopisches, stäubendes Pulver. Mit Wasser quillt es auf. Beim Schmelzen hinterläßt es einen stark sauer reagierenden Rückstand, der ausschließlich aus Metaphosphorsäure besteht. Beim Schmelzen mit Kali wird Kaliumsulfat gebildet. Beim Erhitzen färbt sich Protagon zwischen 150° und 160° gelblich, erweicht zwischen 170° und 180° und schmilzt scharf bei 200° zu einem braunen Sirup.

Optisches Drehungsvermögen[1] $[\alpha]_D^{30} = +8$ (in 5%iger Pyridinlösung)
$[\alpha]_D^{30} = +6{\cdot}8$ „ 3% „ „

Brechungskoeffizient einer 3%igen Pyridinlösung bei 30° = 1·5034
(Pyridin = 1·5062).

Die reinsten bisher erhaltenen Präparate geben die folgenden Analysen:

	Analysen	C	H	N	P	S
Gamgee und *Blankenhorn* (1879)	2mal umkristallisiert	66·34	10·56	2·40	1·032	—
	3 „ „	66·30	10·47	2·29	1·027	—
Cramer (1904)	3 „ „	66·37	10·82	2·29	1·04	0·71
Wilson und *Cramer* (1908)	4 „ „	66·64	10·92	2·41	0·92	—
	5 „ „	66·57	10·98	2·39	0·93	0·73

---

[1]) *Wilson* and *Cramer*, On protagon etc. loc. cit. — A criticism of some recent work on protagon. Quart. Journ. of Experimental Physiology. Vol. 2. p. 91 (1909).

Spaltung des Protagons.

Durch Barytspaltung wird das Protagon in Cerebroside (siehe unten), Glycerinphosphorsäure, eine der Stearinsäure ähnliche Fettsäure, und Cholin gespalten. Aus 10 *g* reinem Protagon wurden 0·85 *g* Cholinplatinchlorid erhalten.[1]) Benutzt man eine wässerige Lösung, so muß man das Protagon erst mit wenig Wasser zu einem feinen Brei anrühren, dem zuerst Wasser und dann Barythydrat zugesetzt wird, und den Brei mehrere Stunden lang kochen. Der gebildete Niederschlag, der aus Barytverbindungen der Cerebrine (über deren Gewinnung siehe unten) und der Fettsäure oder Fettsäuren besteht, wird durch Filtrieren entfernt, das Baryt aus dem heißen Filtrat durch Kohlensäure abgeschieden und die wässerige Lösung, welche Cholin und Glyzerinphosphorsäure enthält, abgedampft. Der Rückstand wird mit kaltem absoluten Alkohol ausgezogen, der Alkohol verdampft, der basische Rückstand mit Salzsäure vorsichtig neutralisiert, in wenig absolutem Alkohol aufgenommen und durch eine absolute alkoholische Lösung von Platinchlorid gefällt. Die Reinigung des Salzes erfolgt durch Zersetzen durch Schwefelwasserstoff in der heißen wässerigen Lösung, Verdampfen des Filtrates, Aufnehmen in absoluten Alkohol und abermaliges Fällen und abermalige Zersetzung. Das so erhaltene Cholinchlorid wird in wenig Wasser gelöst und mit einer konzentrierten wässerigen Lösung von Goldchlorid gefällt.

Das so erhaltene Salz hat den Schmelzpunkt 238—239° bei schnellem Erhitzen. Die Base ist reines Cholin.

Neurin wird gar nicht erhalten.[1]) Gegenteilige Angaben sind irrtümlich.

Analysen	C	H	Au	N
Gefunden	13·54	3·16	44·47	3·16
Berechnet für $C_5H_{14}NOCl + AuCl_3$	13·78	3·34	44·43	3·10

Nach *Rosenheim* und *Tebb*[2]) soll auch Sphingosin gebildet werden. Analytische Belege und experimentelle Angaben fehlen.

Die Barytspaltung wird durch Benutzung einer methylalkoholischen Barytlösung beschleunigt (siehe unten bei Cerebrin).

Durch 20stündiges Kochen mit 0·75%iger Salzsäure wird Galaktose quantitativ abgespalten. Bestimmt man das Reduktionsvermögen, so reduzieren 0·2 *g* Protagon 0·05 *g* Kupfer.[3]) Diese Tatsache ist zur quantitativen Bestimmung des Protagons benutzt worden (siehe unten bei quantitativer Bestimmung des Protagons).

Während bei der Zersetzung mit Baryt die Phosphatidgruppe des Protagons zerstört wird und nur die Cerebrosidgruppe erhalten bleibt, werden bei der Zersetzung durch Alkohol beide Gruppen erhalten. Man erhält dann Cerebron und ein oder mehrere Phosphatide, welche noch nicht genauer

[1]) *Cramer,* On protagon, choline and neurine. l. c. S. 779.

[2]) *Rosenheim* and *Tebb,* The non-existence of protagon as a definite chemical compound. Journ. of Physiol. Vol. **36**. p. 17 (1907).

[3]) *Noll,* Über die quantitativen Beziehungen des Protagons zum Nervenmark. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. **27**. S. 370 (1899).

untersucht worden sind. Nach den Angaben von *Thudichum*, der jedoch nicht mit reinem Protagon, sondern mit einem Rohprodukt gearbeitet hat, müßte sich ein kristallinisches Phosphatid, das Diamidomonophosphatid Sphingomyelin, aus dem durch Alkohol zersetzten Protagon isolieren lassen.

Die sogenannte „fraktionierte Kristallisation des Protagons", welche von *Thudichum* und anderen Forschern[1]) ausgeführt wurde, um die nicht einheitliche Natur des Protagons zu erweisen, ist weiter nichts als eine Zersetzung des Protagons durch lang andauernde Behandlung mit warmem Alkohol unter Entstehung eines oder mehrerer Phosphatide und Cerebroside.

Aus einem durch solche Behandlung zersetzten Protagon lassen sich durch kalten Alkohol und Äther Substanzen ausziehen, die sich durch ihren Phosphorgehalt vom Protagon unterscheiden. Reines unzersetztes Protagon gibt an kalten Alkohol und Äther solche Substanzen nicht ab.

Paranukleoprotagon.[2])

Das Protagon soll in dieser Form an einen Eiweißkörper gebunden im nervösen Gewebe vorhanden sein.

Die zerriebene Gehirnmasse wird mit Chloroform gemischt und 1 bis 2 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Aus dieser Mischung läßt sich das Chloroform schwer abtrennen. Durch Erwärmen auf 45° erfolgt allmählich eine Abscheidung des Chloroforms, so daß dasselbe durch Filtrieren abgetrennt werden kann. Das aus dem Chloroformextrakt sich abscheidende Wasser wird mittelst eines Scheidetrichters abgetrennt; die Chloroformlösung wird mit Essigäther versetzt, bis kein Niederschlag mehr erfolgt. Das erfordert ein ungefähr gleiches Volumen Essigäther. Der sich abscheidende zähe gelbliche Niederschlag sammelt sich an der Oberfläche an und kann so leicht entfernt werden. Er wird zuerst wiederholt mit kaltem Äther gewaschen und dann in einem Soxhletapparat mit Äther und zuletzt mit Chloroform behandelt. Der Rückstand wird im Vakuumexsikator getrocknet und läßt sich dann pulverisieren.

Zusammensetzung:

C	H	N	P
60·79	8·74	6·20	1·62

Dieses in Chloroform nicht lösliche Produkt wird nach Behandlung mit 80%igem Alkohol bei 45° chloroformlöslich, so daß Protagon in das Chloroform übergeht, während ein unlösliches Paranuklein zurückbleibt. Zur Spaltung des Paranukleoprotagons wird dasselbe mit 80%igem Alkohol behandelt, ohne zu filtrieren auf 0° abgekühlt und filtriert. Es wird nicht angegeben, wie lange die Behandlung mit Alkohol dauern soll. *Steel* und *Gies*[3])

[1]) Siehe z. B. *Posner* and *Gies*, Is protagon a mechanical mixture of substances or a definite chemical compound? Journ. of biological chemistry. Vol. **1**. p. 59 (1905).

[2]) *Ulpiani* e *Lelli*, Sul un nuovo proteide del cervello. Gazetta chimica italiana. Vol. **32** (I). p. 466 (1902).

[3]) *M. Steel* and *W. J. Gies*, On the chemical nature of paranucleoprotagon, a new product from brain. Amer. Journ. of Physiology. Vol. **20**. p. 378 (1907/08).

ließen den Alkohol 20 Stunden lang einwirken, wodurch etwa vorhandenes Protagon wenigstens teilweise zersetzt werden würde.

Die feste, auf dem Filter verbleibende Substanz wird in einem Soxhletapparat mit Chloroform extrahiert. Aus dem Chloroformextrakt wurde durch Essigäther eine Substanz ausgefällt, aus welcher durch Kochen mit Salzsäure ein *Fehling*sche Lösung reduzierender Körper abgespalten werden kann. Diese ausgefällte Substanz soll Protagon sein.

Analyse	C	H	N	P
	66·07	10·50	2·57	1·31

Der bei der Chloroformextraktion zurückbleibende Rückstand ist unlöslich in Alkohol, Äther und Chloroform, löslich in schwachen Alkalien, aus denen es durch Säuren wieder ausgefällt wird. Es gibt die Biuret- und *Millon*sche Probe und wird von Pepsin nicht angegriffen. Durch Kochen mit 10%iger Schwefelsäure wurden Purinbasen nicht abgespalten. Beim Kochen mit Kalilauge wird es in Phosphorsäure und Albumin gespalten.

Analyse	C	H	N	P
	54·43	7·71	11·41	1·88

Alle diese Substanzen sind schlecht charakterisiert, und es ist sehr fraglich, ob es sich um einheitliche Substanzen handelt, und ob die abgespaltene chloroformlösliche Substanz mit Protagon identisch ist und nicht ein Gemisch von Zersetzungsprodukten desselben darstellt. Nachprüfungen der Angaben durch *Steel* und *Gies* haben zu Körpern geführt, die einen ganz anderen Phosphorgehalt haben. Das kann zum Teil daran liegen, daß die Angaben von *Ulpiani* und *Lelli* über die Darstellung der verschiedenen Substanzen experimentelle Einzelheiten vermissen lassen. Weitere Untersuchungen sind hier erforderlich.

Cerebroside.

Allgemeines.

Zu dieser Gruppe gehören eine Reihe von Substanzen, welche von verschiedenen Autoren auf verschiedene Weise aus verschiedenem Ausgangsmaterial hergestellt worden sind: nämlich die Cerebrine verschiedener Autoren, das dem Cerebrin nahestehende Homocerebrin (oder Kerasin) und das Enkephalin, das Pseudocerebrin, das Cerebron und das Phrenosin. Nach Ansicht des Verfassers sind diese Substanzen in folgender Weise zu gruppieren und werden dementsprechend abgehandelt:

Das Pseudocerebrin und Cerebron, über deren von *Cramer*[1]) aufgedeckte Identität kein Zweifel besteht[2]), scheinen reine Präparate zu sein. Diese Substanz wird unter dem Namen Cerebron behandelt.

[1]) *Cramer*, On Protagon, Cholin and Neurine. l. c. S. 780; *Lochhead* and *Cramer*, On the phosphorus percentage of various samples of protagon. l. c. S. 779, Note 1.

[2]) *Thierfelder*, Über das Cerebron. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 43. S. 21 (1904).

Die durch Barytspaltung erhaltenen Cerebrine von *Parcus* und von *Kossel* und *Freytag* zeigen vollkommene Identität und scheinen ebenfalls reine Präparate zu sein. Dieselben sind dem Cerebron sehr ähnlich und unterscheiden sich von letzterem nur durch Unterschiede im Schmelzpunkt und Stickstoffgehalt. Man kann dieselben daher nicht ohne weiteres mit dem Cerebron identifizieren, wie *Gies*[1]) will. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß diese Substanzen aus dem Cerebron durch Einwirkung starker Reagenzien (Baryt) bei der Darstellung entstanden sind. Die Cerebrine anderer Autoren (*Müller, Geoghegan*) sind als stark verunreinigte Präparate aufzufassen und werden nur kurz angeführt werden. Das von *Koch* aus Eisessig erhaltene und Cerebrin benannte Produkt steht dem Cerebron am nächsten und wird dort behandelt werden. Das Phrenosin ist entweder ein unreines Cerebrin oder ein unreines Cerebron.[2])

Zu der Gruppe gehören auch das Aminocerebrininsäureglycosid, welches dem Homocerebrin am ähnlichsten ist und dort Erwähnung findet, und die Cerebrinazide, welche jedenfalls ganz unreine Produkte sind.

Sämtliche Cerebroside spalten beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure Galaktose ab. Mit konzentrierter Schwefelsäure verrieben, geben sie zuerst Gelbfärbung, die ungelösten Flocken färben sich allmählich purpurrot. Mit konzentrierter Schwefelsäure und Rohrzuckerlösung tritt sofortige Purpurfärbung auf.

Die Analysen und Schmelzpunkte sind in der oben gemachten Anordnung in folgender Tabelle (S. 785) zusammengestellt.

Cerebrin, Homocerebrin und Enkephalin.

Das von *Müller*[3]) dargestellte und Cerebrin genannte Präparat wurde durch Kochen des mit Barytwasser angeriebenen Gehirnbreies und Extraktion des dabei erhaltenen Niederschlages mit heißem Alkohol erhalten. Die auskristallisierende Substanz wurde durch Ätherwaschung von Cholesterin etc. befreit und aus kochendem Alkohol umkristallisiert. Es ist ein stark verunreinigtes Präparat.

Geoghegan[4]) erhielt ein Cerebrin von anderer Zusammensetzung dadurch, daß mit kaltem Alkohol und Äther erschöpftes Gehirn mit Alkohol gekocht wurde. Die aus der heiß filtrierten alkoholischen Lösung beim Abkühlen ausfallende Substanz wird mit Äther gewaschen, eine Stunde lang mit Barytwasser gekocht und nach Entfernung des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure aus heißem Alkohol umkristallisiert.

---

[1]) *Posner* and *Gies*, Is protagon a mechanical mixture of substances or a definite chemical compound? Journ. of biological chemistry. Vol. **1**. p. 59 (1905).

[2]) *H. Thierfelder*, Phrenosin und Cerebron. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **46**. S. 518 (1905).

[3]) *Müller*, Über die chemischen Bestandteile des Gehirns. *Liebigs* Annalen der Chemie und Pharmacie. Bd. **105**. S. 361 (1858).

[4]) *Geoghegan*, Über die Konstitution des Gehirns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **3**. S. 332 (1879).

Autor und Datum	Name der Substanz	Analysenzahlen C	H	N	Berechnete Formel	Schmelzpunkt	Vom Verfasser vorgeschlagene Nomenklatur
Gamgee (1880)	Pseudocerebrin	68·89	11·87	1·83	—	210°	**Cerebron**
Thierfelder (1900) . . .	Cerebron	69·16	11·54	1·76	$C_{48} H_{[illegible]} NO_9$	209—212°	
Koch (1902)	Cerebrin	68·73	11·83	1·62	—	192	
Müller (1858)	Cerebrin	68·45	11·20	4·30	—	—	Nicht einheitliche Produkte
Geoghegan (1879) . . .	Cerebrin	68·74	10·91	1·44	—	—	
Parcus (1881)	Cerebrin	69·08 68·84	11·47 11·61	2·13	$C_{70} H_{140} N_2 O_{13}$ oder $C_{76} H_{154} N_2 O_{14}$ oder $C_{80} H_{160} N_2 O_{15}$	170°	**Cerebrin**
Kossel und *Freytag* (1893)	Cerebrin	68·99	11·52	2·25	$C_{70} H_{140} N_2 O_{13}$	176°	
Thudichum (1874) . . .	Kerasin	68·45	11·39	1·74	$C_{46} H_{91} NO_9$	—	**Homocerebrin**
Parcus (1881)	Homocerebrin	70·06	11·59	2·23	Obige Formeln von *Parcus* für Cerebrin $-H_2O$	155°	
Kossel und *Freytag* (1893)	Kerasin	70·00	11·69	2·24	$C_{70} H_{138} N_2 O_{12}$	156°	
Bethe (1902)	Amidocerebrininsäureglycosid	70·19	11·08	1·86	$C_{44} H_{81} NO_8$	179°	(?)
Thudichum (1874) . . .	Phrenosin	66·60	11·20	2·80 (0·7% P)	$C_{34} H_{67} NO_8$	—	Unreines Protagon
Thudichum (1880) . . .	Phrenosin	67·96	11·43	2·00	$C_{41} H_{79} NO_8$	—	Unreines Cerebrin oder unreines Cerebron
Thudichum (1901) . . .	Phrenosin	Analysenzahlen nicht angegeben			$C_{41} H_{79} NO_8$	176	
Parcus (1881)	Enkephalin	68·40	11·60	3·09	$C_{[illegible]} H_{[illegible]} N_{[illegible]} O_{[illegible]}$	150° Vor dem Schmelzen bei 12[illegible]° tritt Zersetzung ein	Wahrscheinlich Zersetzungsprodukt des Cerebrins und Kerasins

Nach *Parcus*[1]) wird das mit kaltem Wasser gewaschene Gehirn durch einen linnenen Sack gepreßt und mit konzentriertem Barytwasser unter Umschütteln zum einmaligen Aufkochen erhitzt. Die Mischung wird stehen gelassen, bis sich das Koagulum abgesetzt hat und die überstehende Lösung klar ist. Ist dieselbe trüb, so muß nach Zusatz einer weiteren Menge von Baryt noch einmal bis zum Aufkochen erhitzt werden. Es wird filtriert, der Niederschlag mit heißem Wasser ausgewaschen, getrocknet und mit kochendem Alkohol unter Schütteln 5—6mal extrahiert und heiß filtriert. Das ausfallende Cerebrin wird durch andauernde warme Ätherwaschung von Cholesterin befreit. 90 Ochsengehirne gaben 250 *g* Rohcerebrin. Dasselbe wird durch wiederholtes Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt bis keine gallertartigen Ausscheidungen mehr auftreten.

Aus der Mutterlauge setzt sich nach zweitägigem Stehen eine Gallerte ab, welche aus Cerebrin, Homocerebrin und Enkephalin besteht. Die Gallerte wird von der Flüssigkeit getrennt. Durch langsames Erkaltenlassen der heißen alkoholischen Lösung kann das zuerst ausfallende Cerebrin entfernt werden. Das Homocerebrin wird vom Enkephalin durch Umkristallisieren aus Aceton getrennt. Die von der Gallerte getrennte alkoholische Lösung enthält weitere Mengen Homocerebrin und Enkephalin, die nach dem Verdampfen des Alkohols durch Umkristallisieren aus Aceton getrennt werden.

Das so erhaltene Cerebrin enthält stets noch Baryum in lockerer Bindung und muß zur vollständigen Reinigung mit Wasser angerieben und durch Kohlensäure vom Baryt befreit werden.

Homocerebrin ist in geringeren Mengen im Gehirn enthalten als Cerebrin, so daß nur ein Viertel der Ausbeute des Cerebrins erhalten wird. Enkephalin entsteht wahrscheinlich aus dem Cerebrin durch Einwirkung des Baryts (wie auch von Salzsäure).

Dieselben Substanzen können leichter in reinem Zustande erhalten werden[2]), wenn man von dem bei der Protagondarstellung erwähnten Rohprodukt ausgeht, welches aus dem heißen alkoholischen Gehirnextrakt auskristallisiert (in der Literatur oft irrtümlich reines Protagon genannt) und Cerebron enthält. Die Spaltung von sorgfältig gereinigtem Protagon ist noch nicht ausgeführt worden.

Das Rohprodukt wird in Methylalkohol gelöst, die Lösung auf dem Wasserbad mit einer methylalkoholischen Lösung von Ätzbaryt versetzt, wobei ein Niederschlag entsteht, und einige Minuten lang auf dem Wasserbad digeriert. Der Niederschlag, welcher aus einer Verbindung der Cerebroside mit Baryt besteht, wird abfiltriert, mit barythaltigem Methylalkohol einmal gewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und vom Baryt durch Durchleiten von Kohlensäure befreit. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Alkohol ge-

[1]) *Parcus*, Einige neue Gehirnstoffe. Journ. f. prakt. Chemie. Bd. 24. S. 310 (1881).

[2]) *Kossel* und *Freytag*, Über einige Bestandteile des Nervenmarks und ihre Verbreitung in den Geweben des Tierkörpers. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 17. S. 431 (1893).

waschen und mit absolutem Alkohol bei 50° ausgezogen. Bei Innehaltung dieser Temperatur sollen die Barytseifen nicht mit in den Alkohol übergehen.

Der alkoholische Extrakt wird auf Zimmertemperatur abgekühlt, wobei sich zuerst Cerebrin ausscheidet, welches nach 2 Stunden abfiltriert wird, während die Abscheidung des Homocerebrins erst nach 5—6 Tagen beendet ist. Die Mutterlaugen werden nach dem Eindampfen auf weitere Mengen Cerebrin und Homocerebrin verarbeitet. Völlige Reinigung erfolgt durch wiederholtes Umkristallisieren aus Alkohol. Ausbeute an Cerebrin und Homocerebrin 50% des Ausgangsmaterials.

Cerebrin und Homocerebrin bilden eine lockere Verbindung mit Baryum.

Eigenschaften. Abgesehen von den angegebenen typischen Cerebrosidreaktionen — Purpurfärbung mit konzentrierter Schwefelsäure und Abspaltung von Galaktose beim Kochen mit Salzsäure — zeigen diese Substanzen die folgenden Eigenschaften:

Cerebrin kristallisiert aus Alkohol in schwach lichtbrechenden, radiär gestreiften Knöllchen mit glatten Rändern. Aus Azeton fällt es in Flocken aus. Getrocknet ist es ein weißes, lockeres, schwach hygroskopisches Pulver, leicht löslich in kochendem Alkohol sowie in heißem Benzol, Chloroform, Aceton, Eisessig. Unlöslich in heißem Äther.

Homocerebrin. Löst sich in allen Lösungsmitteln des Cerebrins, außerdem noch in heißem Äther. Es ist in absolutem Alkohol leichter löslich als Cerebrin und scheidet sich beim raschen Abkühlen aus diesem Lösungsmittel in Flocken, beim langsamen Abkühlen in Form von Gallerten ab, was für diese Substanz charakteristisch ist. Diese Gallerten bestehen aus mikroskopisch feinen, langen Nadeln. Nach dem Trocknen ist es eine wachsartige, schwer zerreibliche Masse (Unterschied von Cerebrin), welche Alkohol zurückhält.

Das Cerebrin und Homocerebrin quellen mit Wasser auf, werden aber durch Kochen der wässerigen Lösung nicht zersetzt. Mit Barytwasser bilden sie lockere Baryumverbindungen. Durch andauerndes Kochen mit Barytwasser sollen sie zersetzt werden (?).

In Benzol aufgeschwemmt addieren sie 3 Moleküle Brom und gehen in Lösung. Wird das Benzol an der Luft verdunstet, so bleibt eine glasige, durchsichtige Schicht zurück, die sich nach dem Trocknen pulverisieren läßt und den folgenden Bromgehalt hat:

Bromcerebrin . . . . 16·66% und 16·30%
Bromhomocerebrin . . 17·25% „ 16·93%

Die Bromverbindungen sind in Äther und Alkohol, besonders leicht in Benzol löslich. Sie sind optisch aktiv.

Tribromhomocerebrin $[\alpha]_D = -12{\cdot}48^0$ in 11%iger Benzollösung bei Zimmertemperatur.

Das Molekulargewicht des Homocerebrins wurde durch Erhöhung des Siedepunktes der Lösung in Eisessig bestimmt. Drei Bestimmungen ergaben:

945, 972, 1027.

Spaltung. Bei der Spaltung durch Salpetersäure wurde eine Fettsäure gebildet, welche für Stearinsäure gehalten wurde. Diese Annahme, welche von *Thudichum* scharf bekämpft wurde, der die Säure für ein bei 84° schmelzendes Isomeres der Stearinsäure hielt, stützt sich auf die folgenden Angaben:

	Schmelzpunkt	Baryumbestimmung des Barytsalzes
Fettsäure aus Cerebrin . . .	69—70°	19·23%
„ „ Homocerebrin .	69—70°	—
„ „ Stearinsäure . .	68°	19·48%

Eine Fraktion der Fettsäure zeigte einen höheren Schmelzpunkt, 73 bis 75° und 75—78°, was auf Beimischung unveränderten Cerebrins resp. Homocerebrins zurückgeführt wird. Durch abermaliges Kochen mit Salpetersäure wird der Schmelzpunkt auf 69—70° erniedrigt.

Die Menge der abgespaltenen Stearinsäure ist

aus Cerebrin . . . 68%
„ Homocerebrin . 74%

was 3 Molekülen Stearinsäure aus 1 Molekül Cerebrin resp. Homocerebrin entspricht.

Die Spaltung mit Salpetersäure wird in folgender Weise ausgeführt: Ca. 1 *g* Cerebrosid wird mit 15 cm^3 konzentrierter Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1·52) übergossen, umgeschüttelt und 45 cm^3 Wasser zugefügt. Das Gemisch wird unter Umschütteln am Rückflußkühler auf dem Wasserbad erwärmt, wobei zuerst eine heftige Reaktion auftritt. Wenn die Gasentwicklung nachläßt, wird die Flüssigkeit über kleiner Flamme mehrere Stunden lang in schwachem Sieden erhalten. Nach dem Erkalten wird die Säure von der erstarrten Masse abgegossen und letztere einige Male mit Wasser ausgekocht.

Eine systematische Untersuchung der Spaltungsprodukte des Cerebrins und Homocerebrins ist noch nicht ausgeführt worden. Unter Anwendung der für die Spaltung des Cerebrons angegebenen Methoden wäre es möglich, mit Sicherheit festzustellen, in welcher Beziehung sich das Cerebron vom Cerebrin und Homocerebrin unterscheidet.

Enkephalin verhält sich in bezug auf seine Löslichkeit wie Homocerebrin und kann wie dieses aus dem Alkohol als Gallerte ausfallen. In reinem Zustande kristallisiert es aus Alkohol in leicht gekrümmten Blättchen. Mit heißem Wasser quillt es auf und bildet einen Kleister, der auch nach dem Erkalten bestehen bleibt.

Aminocerebrininsäureglykosid.

Diese anscheinend dem Homocerebrin ähnliche Substanz wurde von *Bethe* [1]) durch eine eigentümliche Kupfermethode erhalten. Diese Methode

[1]) *Bethe*, Über einige Edukte des Pferdegehirns. Archiv f. experim. Path. u. Pharmakologie. Bd. 48. S. 73 (1902).

sowie die Darstellung dieser Substanz wird weiter unten bei den Phosphatiden gegeben.

Eigenschaften. Kristallisiert aus neutralem Alkohol in Sternen, aus saurem Alkohol in Sphärokristallen. Löslich in Benzol, Chloroform und heißem Alkohol, schwer löslich in kaltem Alkohol, unlöslich in Äthyläther und Petroläther. Bildet Salze mit Baryum und Kupfer, welche in heißem Alkohol unlöslich sind.

Spaltung. Durch $^3/_4$stündiges Kochen mit Salzsäure im Kohlensäurestrom wird außer Galaktose eine stickstofffreie Säure und ein stickstoffhaltiger Körper erhalten. Bei zu langem Kochen mit Salzsäure treten weitergehende Zersetzungen auf.

Die stickstofffreie Säure, welche den Namen Cerebrininsäure erhielt, soll mit *Thudichums* Neurostearinsäure identisch sein. Sie zeigt die folgende Zusammensetzung und Schmelzpunkt:

	C	H	Schmelzpunkt
Gefunden	76·96	12·71	78°
	76·99	13·50	80°
Berechnet für $C_{19}H_{36}O_2$	77·02	12·16	—

Die Reinheit dieses Produktes wird vom Verfasser selbst bezweifelt.

Die stickstoffhaltige Substanz hat schwach basische und schwach saure Eigenschaften und soll mit dem Sphingosin identisch sein. Es wird als salzsaures Salz erhalten (Schmelzpunkt 105—107°), welches in Äther unlöslich, in heißem Alkohol löslich ist und daraus beim Erkalten in Sphärokristallen oder -Nadeln sich ausscheidet. Beim Kochen mit Kalilauge wird Ammoniak abgespalten und bei 84° schmelzende Cerebrininsäure bleibt zurück, so daß also die stickstoffhaltige Substanz Amidocerebrininsäure ist.

Cerebron.

Diese Substanz kommt in dem bei der Protagondarstellung erhaltenen Rohprodukt vor, welches aus dem heißen alkoholischen Gehirnextrakt beim Erkalten auskristallisiert und von vielen Autoren irrtümlicherweise als reines Protagon angesehen wird. Aus diesem Rohprodukt erhielt *Gamgee*[1]) das Cerebron derart, daß der beim Auskristallisieren zurückbleibende Rückstand mehrfach aus Alkohol umkristallisiert wurde, bis die ausfallenden Substanz phosphorfrei war.

In ähnlicher Weise erhielt *Koch*[2]) eine wahrscheinlich mit dem Cerebron identische Substanz durch wiederholtes Umkristallisieren des mit Alkohol gekochten Rohproduktes aus Eisessig. Spätere Angaben[3]) scheinen anzu-

[1]) *A. Gamgee*, Textbook on the Physiological chemistry of the animal body. Vol. 1. p. 441. London 1880.

[2]) *W. Koch*, Zur Kenntnis des Lezithins, Kephalins und Cerebrins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 36. S. 134 (1902).

[3]) *Koch*, Some chemical observations on the nervous system in certain formes of insanity. Archives of Neurology. Vol. 3. p. 332 (1907).

deuten, daß dieses Cerebrin noch unrein war und beträchtliche Mengen Schwefel (0·8%) enthielt.

Die Ausbeute an Cerebron ist um so besser, je länger der Gehirnbrei bei der Extraktion mit warmem oder kochendem Alkohol behandelt worden ist.

Wird reines Protagon durch stundenlang andauernde Behandlung mit warmem oder kochendem Alkohol zersetzt, so kann aus dem Zersetzungsgemisch Cerebron isoliert werden.

Am besten wird die Substanz nach *Thierfelder*[1]) auf folgende Weise erhalten:

Der mit Azeton entwässerte Gehirnbrei wird mit Äther völlig extrahiert. Die aus den ätherischen Auszügen bei 0° auskristallisierende Masse wird dem Gehirnbrei zugefügt und die Masse mit 85%igem Alkohol bei 45—50° wiederholt ausgezogen. Die Ausscheidungen werden gesammelt, mit Äther gewaschen, getrocknet und in 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol gelöst, und zwar werden 100 Teile des ausgeschiedenen Rohproduktes in 500 Teilen dieser Mischung unter leichtem Erwärmen gelöst. Nach dem Filtrieren wird die Flüssigkeit in einem verschlossenen Kolben bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang stehen gelassen. Die sich an der Oberfläche ausscheidende weiße Masse wird von der Lösung durch Filtrieren getrennt, das Filtrat abgekühlt und die dabei ausfallende Masse durch wiederholtes Umkristallisieren aus der Chloroform-Methylalkoholmischung gereinigt, bis die Abscheidung wieder in Form einer harten weißen Kruste an der Oberfläche erfolgt. Die Mutterlaugen können nach dem Abdampfen im Vakuum in gleicher Weise verarbeitet werden, so daß weitere Mengen der oben beschriebenen, charakteristisch an der Oberfläche sich abscheidenden Substanz erhalten werden. All diese Abscheidungen werden vereinigt und in der 30fachen Menge einer Mischung von 1 Teil Chloroform und 4 Teilen Methylalkohol heiß gelöst. Das beim Erkalten sich ausscheidende Cerebron wird weiter gereinigt mittelst einer Lösung von Zinkhydroxyd in Methylalkohol, welche durch Einleiten von Ammoniak in das in Methylalkohol suspendierte Zinkhydroxyd und Zufügen von Ammoniumazetat bereitet wird. Dieses Reagens wird heiß zu einer heißen Lösung des Cerebrons in 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol zugefügt. Die Mischung wird gekocht, bis sich die entstandene Trübung zu einer flockigen Masse zusammengeballt hat, welche fast alle phosphorhaltigen Verunreinigungen enthält. Der aus dem klaren Filtrat beim Erkalten sich abscheidende Niederschlag wird abfiltriert und aus der Chloroform-Methylalkoholmischung (1:10) noch einmal umkristallisiert, wobei nur noch eine geringe Menge einer zink- und phosphorhaltigen Substanz ungelöst zurückbleiben soll. Beim Erkalten des Filtrates kristallisiert das Cerebron in glitzernden Kristallblättchen aus.

---

[1]) *Kitagawa* und *Thierfelder,* Über das Cerebron. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. 49. S. 286 (1906).

Eigenschaften des Cerebrons.[1])

Die Chloroformlösung des Cerebrons nimmt Brom auf. Die Bromverbindung bleibt beim Verdunsten als spröde, amorphe Masse zurück. Es ist optisch aktiv $[\alpha]_D^{20} = +7{\cdot}6^0$ in $5^0/_0$iger chloroform-methylalkoholischer Lösung. Cerebron ist in reinem sowie in benzol- oder chloroformhaltigem Alkohol in der Wärme löslich und scheidet sich beim Erkalten aus. Aus $50^0/_0$ Benzol enthaltendem Alkohol scheidet es sich in knollenartigen Formen ab, aus $20^0/_0$ Chloroform enthaltendem Azeton kristallisiert es in Form von konzentrisch angeordneten Nädelchen oder Blättchen. Die Kristallform scheint sehr wechselnd zu sein. Durch einstündiges Kochen mit kaltgesättigter Barytlösung wird es nicht verändert.[2])

Wird das amorphe Cerebron in $85^0/_0$igem Alkohol aufgeschwemmt und auf 50^0 1 Stunde lang erwärmt, so backt die Masse zusammen und lagert sich allmählich in nadel- oder blättchenförmige Kristalle um, die aus den Knollen herausgewachsen sind. Wird das Erwärmen noch länger fortgesetzt, so sind alle knollenartigen Gebilde verschwunden und alles ist in feine, durcheinander geschobene Blättchen, die häufig als unvollkommen ausgebildete Tafeln mit ganz scharfen Begrenzungslinien erscheinen, verwandelt. Makroskopisch sieht man die Flüssigkeit von prachtvoll glänzenden Flitterchen erfüllt. Der Anblick erinnert an Cholesterin. Getrocknet ist es eine weiße, verfilzte, glänzende Masse von elastischer Beschaffenheit.

Bei dieser für das Cerebron charakteristischen Umlagerung wird Wasser aufgenommen, wie die Analyse zeigt:

C $67{\cdot}99^0/_0$ H $11{\cdot}75^0/_0$.

Das Cerebron gibt die typische Cerebrosidreaktion mit konzentrierter Schwefelsäure und spaltet Galaktose ab.

Spaltung des Cerebrons.[3])

2 *g* Cerebron werden mit 110—150 *cm*³ Methylalkohol, welcher $10^0/_0$ konzentrierte Schwefelsäure enthält, am Rückflußkühler auf dem Wasserbad erhitzt. Es tritt zuerst eine heftige Reaktion ein, dann löst sich die Substanz völlig auf. Nach 4stündigem Erhitzen kühlt man die Mischung bis unter 0^0 durch Einstellen in eine Kältemischung ab.

Cerebronsäure. Nach erfolgter Abscheidung wird die schneeweiße Masse abgesaugt und mit schwefelsäurehaltigem Methylalkohol ausgewaschen, in warmem Äther gelöst und die ätherische Lösung von der sich absetzenden Schwefelsäure getrennt. Nach dem Verdunsten des Äthers wird der Rück-

---

[1]) *Wörner* und *Thierfelder*, Über die chemische Zusammensetzung des Gehirns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **30**. S. 542 (1900).

[2]) Privatmitteilung von Prof. *Thierfelder*.

[3]) *Thierfelder*, Über das Cerebron. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 21 (1904). — *Thierfelder*, Über das Cerebron. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **44**. S. 366 (1905). — *Kitagawa* und *Thierfelder*, Über das Cerebron. III. Mitteilung. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. **49**. S. 286 (1906).

stand wiederum in Äther gelöst und das Verfahren fortgesetzt, bis die Schwefelsäure völlig entfernt ist. Die so erhaltene Substanz ist ein Gemisch der freien Cerebronsäure, welche nur bei saurer Reaktion in Äther löslich ist, und des Cerebronsäuremethylester, welcher auch bei alkalischer Reaktion in den Äther übergeht.

Zur Trennung wird die ätherische Lösung mit alkoholischer Natronlauge alkalisch gemacht, der entstehende Niederschlag abfiltriert, mit Äther gewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und nach Zusatz von Schwefelsäure durch Schütteln mit Äther gelöst. Der durch Verdunsten des Äthers erhaltene Rückstand stellt nach dem Umkristallisieren aus heißem Alkohol Cerebronsäure dar. Das Filtrat, welches den Methylester enthält, wird mit Wasser geschüttelt, verdunstet und der Rückstand aus warmem 96%igem Alkohol umkristallisiert. Der Ester wird durch halbstündige Verseifung mit Natriumalkoholat (2·5% Na, gelöst in Alkohol) auf dem Wasserbad in die freie Säure übergeführt.

Galaktose, Sphingosin und namenlose Base. Die Flüssigkeit, welche von der ausgeschiedenen Cerebronsäure und ihrem Ester getrennt worden war, enthält Galaktose als Methylgalaktosid, das Sulfat des Sphingosins und das Sulfat einer anderen, dem Sphingosin ähnlichen Base. Zur Trennung und Bestimmung der Galaktose wird die Lösung in einem Kolben nach Zusatz von 300 cm^3 Wasser 5 Stunden zuerst auf dem Wasserbad erhitzt und nach weiterem Wasserzusatz bis auf 120 cm^3 eingedampft. Aus der klaren Flüssigkeit scheidet sich beim Erkalten das Gemisch der Basensulfate als eine leicht rötlich gefärbte weiße Masse ab, die sich im Zusammenhang herausheben läßt.

Die Flüssigkeit enthält nur Galaktose, deren Menge durch Titrieren ermittelt werden kann (21·83% des Cerebrons).

Das ausgeschiedene Gemenge der Sulfate wird mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nur noch eine schwache Schwefelsäurereaktion gibt. Nach dem Trocknen im Vakuum wird die Masse mit Äther extrahiert. Der Rückstand wird in reinem absoluten Alkohol gelöst, filtriert, eingeengt und im Vakuum getrocknet. Die Substanz besteht zum größten Teil aus Sphingosinsulfat, welchem das Sulfat einer anderen dem Sphingosin ähnlichen Base in geringer Menge beigemischt ist. Das Sulfat der zuletzt erwähnten Base ist leichter löslich in heißem Alkohol als Sphingosinsulfat und kristallisiert auch in anderen Formen (siehe Tabelle S. 794 u. 795).

Das Sulfatgemenge der Basen kann durch fraktionierte Kristallisation in das Sphingosinsulfat und das Sulfat der namenlosen Base getrennt werden. Zur weiteren Reinigung der letzteren wird das Sulfat in alkoholischer Natronlauge gelöst, aus der Lösung durch viel Wasser und Natronlauge die freie Base ausgefällt und dieselbe dann mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Äthers wird der Rückstand in warmem Alkohol gelöst und tropfenweise unter Rühren und Reiben der Wandung mit einem Glasstab alkoholische Salzsäure zugesetzt. Nach einiger Zeit scheiden sich glitzernde Blättchen ab, deren Bildung bei weiterem Zusatz der Salzsäure

bis zur schwach alkalischen oder neutralen Reaktion zunimmt. Aus der Mutterlauge können durch Ätherzusatz und starkes Abkühlen weitere Mengen des Chlorids erhalten werden.

Aus dem gereinigten Chlorid kann in der schon angegebenen Weise die freie Base in ätherischer Lösung erhalten werden, aus welcher sie sich beim Einengen in großen Kristallen abscheidet. Aus der alkoholischen Lösung der Base wird durch Zusatz von alkoholischer Schwefelsäure oder alkoholischer Salzsäure das Sulfat resp. das Chlorid abgeschieden.

Bei einstündiger Spaltung des Cerebrons mit der 25fachen Menge wässeriger 7%iger Schwefelsäure scheint nur der schwerer lösliche Anteil des Basengemisches, das Sphingosinsulfat, gebildet zu werden. Weitere Untersuchungen über die vollkommene Identität der beiden Sphingosine stehen noch aus. Die in der Tabelle angegebenen Daten beziehen sich auf das durch wässerige Schwefelsäurespaltung erhaltene Sphingosinsulfat. Die Spaltung mit wässeriger Schwefelsäure wird in einer Druckflasche in kochendem Wasserbade unter beständigem Schütteln ausgeführt.

Phrenosin.

Die ursprünglich[1]) von *Thudichum* mit dem Namen Phrenosin bezeichnete Substanz war ihrer Darstellung nach ein stark verunreinigtes oder zersetztes Protagon, deren Phosphorgehalt übersehen wurde. Später[2]) wurde zugegeben, daß diese Präparate bis 0·78% Phosphor enthielten und der unten angegebene Weg zur Entfernung der Phosphatide eingeschlagen. Der Name Phrenosin wurde dann ohne weiteres auf dieses ganz verschiedene phosphorarme Präparat übertragen. Die Reindarstellung ist jedoch nie völlig gelungen und die Zusammensetzung wurde aus den Spaltungsprodukten ermittelt. Das Phrenosin ist entweder mit dem Cerebron oder mit dem Cerebrin identisch, welche jedoch beide besser definiert sind. Es hat denselben Schmelzpunkt wie das Cerebrin, 176°. Da das Phrenosin selbst in den Händen seines Entdeckers solchen radikalen Umwandlungen unterlegen ist, ohne daß schließlich ein reines Präparat erhalten wurde, so wäre es zweckmäßig, den Namen überhaupt fallen zu lassen.

Die Darstellung erfolgt aus der Substanz, die sich beim Auskochen des Gehirns mit Alkohol aus der alkoholischen Lösung beim Erkalten absetzt. Diese Substanz wird im Mörser mit einer alkoholischen Lösung von

---

[1]) *Thudichum*, Researches on the chemical constitution of the brain. Reports of the Medical Officer of the Privy Counceil and Local Government Board. New Series No. III. p. 185, 186. London 1874.

[2]) *Thudichum*, Further Researches on the chemical constitution of the brain. Ninth Annual Report of the Local Government Board (1879—1880). Supplement containing the Report of the Medical Officer for 1879. p. 143. London 1880. *Thudichum* hat eine endgültige Zusammenfassung seiner Anschauungen in einem 1901 veröffentlichten Buch „Über die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere" (Tübingen) gegeben. Die im Folgenden gemachten Hinweise auf *Thudichums* Angaben beziehen sich auf dieses Werk.

Spaltungsprodukte

Spaltungsprodukt	Derivate	Analysen		Schmelzpunkt
		Gefunden (Mittel)	Berechnet für	
Cerebronsäure			$C_{25}H_{50}O_3$	99°
		C 75·33%	75·38%	
		H 12·50%	12·56%	
	Natronsalz		$C_{25}H_{49}NaO_3$	
		Na { 5·25% / 5·63%	5·48%	
	Azetylverbindung	Analysiert als Natronsalz	$C_{25}H_{48}O_3Na(CH_3CO)$	
		C 70·00%	70·13%	
		H 11·30%	11·04%	
		Na 5·14%	4·98%	
	Methylester		$C_{25}H_{49}O_3 . CH_3$	65°
		C 75·85%	75·73%	
		H 12·53%	12·62%	
Galaktose	—	—		—
Sphingosin				
	Sulfat		$(C_{17}H_{35}NO_2)_2H_2SO_4$	Bei 240—250° unter Gasentwicklung zersetzt, ohne zu schmelzen
		C 61·09%	61·08%	
		H 10·87%	10·78%	
		N 4·08%	4·19%	
		H_2SO_4 14·85%	14·67%	
Namenlose Base (aus unreinem Sphingosinsulfat isoliert)			$C_{19}H_{39}NO_2$	87°
		C 72·58%	72·76%	
		H 12·68%	12·54%	
	Chlorid		$C_{19}H_{39}NO_2HCl$	132—133°
		C 65·54%	65·18%	
		H 11·46%	11·52%	
		N 4·14%	4·01%	
		Cl 10·27%	10·13%	
	Sulfat			

des Cerebrons.

Eigenschaften und Kristallform	Löslichkeit	Ausbeute
Schneeweiße, leicht pulverisierbare, nicht hygroskopische Substanz. Runde oder ovale, manchmal gelappte, radiär gestreifte Gebilde.	Leicht löslich in Äther bei saurer Reaktion und in warmem Alkohol.	48·10%
Schneeweiße, stark elektrische Substanz. Aus Alkohol in Nadeln, zu Sternen vereinigt oder, wenn einzeln liegend, stark gebogen. Auch in knollenartigen Gebilden.	In Wasser unlöslich, in heißem Alkohol schwer löslich.	(Freie Säure und Methylester)
Die konzentrierte alkoholische Lösung erstarrt beim Erkalten zu einer Gallerte, die aus sehr feinen, langen Fäden besteht. Das Natronsalz kristallisiert aus Alkohol in sehr feinen Nädelchen oder Prismen.	Leicht löslich in Alkohol, Methylalkohol, Äther, Chloroform.	
Nicht hygroskopisch. Aus 96%igem Alkohol in langen, geraden, zu lockeren Sternen vereinigten Nadeln.	Löslich in Äther, auch bei alkalischer Reaktion, und in warmem Alkohol.	
—	—	21·83%
Weiße, undeutlich kristallinische Masse von alkalischer Reaktion. Kristallisiert nicht. Die alkoholische Lösung gibt mit Schwefelsäure einen Niederschlag, der beim geringsten Überschuß der Schwefelsäure wieder verschwindet. Beim Erhitzen auf dem Platinblech tritt ein Geruch nach verbranntem Fett auf.	Leicht löslich in Äther, Alkohol, Methylalkohol, Aceton, Petroläther. In Wasser unlöslich.	
Weiße, stark hygroskopische Substanz, die in ganz trockenem Zustande sich leicht pulverisieren läßt. Kristallisiert aus Alkohol in spießigen, mit kleinen Nadeln besetzten Kristallen oder in zu Rosetten vereinigten Nädelchen. Addiert Brom.	In Wasser und Äther unlöslich, in kaltem Chloroform wenig, in warmem leicht löslich. In kaltem Alkohol schwer löslich; Zusatz einiger Tropfen H_2SO_4 bewirkt sofortige Lösung. In heißem Alkohol leicht löslich.	41·37% (rohes Sphingosinsulfat, verunreinigt mit etwa 4% des Sulfates der namenlosen Base
Aus warmem Äther in großen, zentimeterlangen nadelförmigen Kristallen, welche aus langen schmalen Blättchen bestehen. Leicht pulverisierbar. Die alkoholische Lösung addiert Brom. Beim Erhitzen tritt ein Geruch nach verbranntem Fett auf.	In Wasser unlöslich, in kaltem Äther schwer, in warmem Äther leicht löslich.	
Kristallisiert aus Alkohol in großen, glashellen, durcheinander geschobenen, rechtwinkeligen Tafeln mit geraden Begrenzungslinien. Mikroskopisch und makroskopisch dem Cholesterin ähnlich. Im trockenen Zustande eine zusammenhängende, stark silberglänzende Masse, die sich nur schwer zerreiben läßt. Addiert Brom.	In Wasser und Äther unlöslich, in kaltem Alkohol etwas, in warmem Alkohol leicht löslich.	4%
In knolligen drüsigen Massen aus Alkohol.	Leichter löslich in heißem Alkohol als Sphingosinsulfat.	

Bleizucker, der kleine Mengen von Ammoniak beigesetzt sind, verrieben und in heißen 85%igen Alkohol eingetragen. Dann wird Bleizucker und Ammoniak zugesetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht, filtriert und der Niederschlag mit kochendem Alkohol ausgekocht. Beim Erkalten des Filtrates bis 28° fällt Phrenosin aus, bei weiterem Abkühlen Homocerebrin (Kerasin), welch letzteres auch aus den Mutterlaugen bei längerem Stehen sich absetzt. Durch 6—8mal wiederholte fraktionierte Kristallisation läßt sich auf diese Weise das Phrenosin vom Homocerebrin trennen.

Die so erhaltenen Phrenosinpräparate waren stets noch mit einem Phosphatid behaftet. Bei der Spaltung mit Säure entstehen Sphingosin, Galaktose und Neurostearinsäure. Die letztere hat den Schmelzpunkt 84° und die folgende Zusammensetzung:

C	75·88%
H	12·85%

Thudichum hält die Säure für eine Isomere der Stearinsäure. Sie ist wohl entweder mit der aus Cerebron erhaltenen Cerebronsäure identisch, in welchem Falle das Phrenosin ein unreines Cerebron ist, oder mit der aus dem Cerebrin erhaltenen Fettsäure identisch, in welchem Falle das Phrenosin als ein unreines Cerebrin anzusehen wäre.

Thudichum gibt merkwürdigerweise an, daß das Phrenosin durch Baryt leicht zersetzt wird, was weder für das Cerebron noch für das Cerebrin gilt.

Bei der partiellen Hydrolyse des Phrenosins mit Barythydrat unter Druck oder mit alkoholischer Schwefelsäure soll Psychosin gebildet werden. Das salzsaure Salz dieser Base ist in Wasser leicht löslich und unterscheidet sich dadurch vom Sphingosin. Bei weiterer Spaltung zerfällt Psychosin in Sphingosin und Galaktose.

Analyse:	C	61·59
	H	10·09
	N	2·96

Bei der Hydrolyse mit Salpetersäure entstehen Neurostearinsäure, Schleimsäure und Phrenylin, welches aus Alkohol in gekrümmten Nadeln kristallisiert, bei 115—130° schmilzt, 2% Stickstoff enthält und die *Pettenkofer*sche Reaktion gibt.

Cerebrinazide. [1]

Die Substanzen bilden Verbindungen mit Schwermetallen und finden sich in dem Niederschlag, der, wie bei der Darstellung des Phrenosins beschrieben, durch Bleizucker in der heißen alkoholischen Lösung der Cerebroside hervorgebracht wird. Nachdem das Phrenosin und das Homocerebrin durch kochenden Alkohol aus diesem Niederschlag ausgezogen worden sind, bleibt ein unlöslicher Rückstand der Bleisalze der Cerebrinazide.

[1]) *Thudichum*, Chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. S. 220—224. Tübingen 1901.

Cerebrinsäure. Ein Teil der Bleisalze wird durch kalten Benzol ausgezogen. Das Benzol wird abdestilliert, der Rückstand in heißem Alkohol aufgeschwemmt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus der heißen alkoholischen Lösung kristallisiert beim Erkalten die Cerebrinsäure in Nadeln aus, die durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt wurden. Mit konzentrierter Schwefelsäure gibt es nur schwache Purpurfärbung.

Analyse:	C	67·00
	H	11·36
	N	1·59

Sphärocerebrin. Der in Benzol unlösliche Teil der Bleisalze wird durch Kochen mit einem Überschuß von Oxalsäure in alkoholischer Lösung zersetzt, heiß filtriert, die ausgeschiedene kristallinische Masse nach dem Trocknen mit kaltem Benzol ausgezogen und aus heißem Benzol auskristallisiert. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden dann in einem großen Volumen absoluten Alkohols gelöst und auf 38° abgekühlt, wobei sich schwere, dem Glas anhängende Sphärokristalle absetzten. Die Mutterlauge wird bei 40° abgegossen. Durch zweimaliges Umkristallisieren und Abkühlen auf 40° können die Kristalle gereinigt werden.

Die Kristalle bestehen aus runden Ballen, die sich durch leichten Druck in drei keilförmige Segmente spalten lassen, welche aus fächerförmig zusammenliegenden Nadeln gebildet sind.

Mit konzentrierter Schwefelsäure gibt es nur schwache Purpurfärbung.

Analyse:	C	62·75
	H	11·08
	N	1·23

Thudichum gibt selbst an, daß diese beiden Cerebrinazide jedenfalls nicht in reinem Zustande erhalten wurden. Sie sind nur in sehr geringen Mengen im Nervengewebe vorhanden und sind wahrscheinlich Zersetzungsprodukte.

Cerebrosulfatide.

Thudichum [1]) und neuerdings *Koch* [2]) haben versucht, eine schwefelhaltige Lipoidsubstanz aus dem Nervengewebe zu isolieren. Alle diese Bemühungen sind bis jetzt erfolglos gewesen. Hätten sich diese Forscher nicht so sehr von vorgefaßten Meinungen über das Protagon leiten lassen, so hätten sie in dieser Substanz das Cerebrosulfatid, nach dem sie suchten, gefunden. In der Tat ist die einzige wohldefinierte schwefelhaltige Lipoidsubstanz, die *Koch* isolieren konnte, eine Substanz von der Zusammensetzung des Protagons gewesen. Merkwürdigerweise zieht aber dieser Forscher vor, das

[1]) *Thudichum*, l. c. S. 225.

[2]) *Koch*, Zur Kenntnis der Schwefelverbindungen des Nervensystems. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 53. S. 496 (1907). — Some chemical observations on the nervous system in certains forms of insanity. Archives of Neurology. Vol. 3. p. 331 (1907).

Protagon als ein Gemisch zurückzuweisen und das Vorhandensein einer hypothetischen schwefelhaltigen Substanz, die noch niemand hat isolieren können, zu postulieren.

Phosphatide.

Allgemeines.

Neben dem Lezithin, welches an anderer Stelle behandelt worden ist, kommen nach *Thudichum* im Gehirn noch eine große Anzahl ähnlicher Verbindungen der Glyzerinphosphorsäure [1]) vor. Die Trennung dieser Verbindungen voneinander und die Reindarstellung bieten jedoch, wie *Thudichum* selbst angibt, große Schwierigkeiten dar, und viele der von diesem Autor dargestellten Präparate machen nicht den Eindruck einheitlicher Substanzen.

Während neuere Arbeiten über die Phosphatide anderer Gewebe die Anschauung *Thudichums* bestätigt haben, daß neben dem Lezithin noch andere Phosphatide existieren, haben sie zugleich gezeigt, daß die von *Thudichum* angewendeten Methoden der Extraktion und Trennung Zersetzung herbeiführen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß eine große Anzahl der *Thudichum*schen Edukte Gemische von Zersetzungsprodukten darstellen. Eine eingehende Behandlung dieser Edukte würde daher dem Zwecke dieses Werkes nicht entsprechen. Es ist jedoch neuerdings Mode geworden, mit den Namen, welche *Thudichum* seinen zweifelhaften Produkten beigelegt hat, Substanzen von verschiedener Konstitution, welche von anderen Autoren isoliert worden sind, zu bezeichnen. So wird der Name Kephalin, den *Thudichum* einem Phosphatid beigelegt hat, welches bei der Verseifung Neurin und zwei andere N-haltige Basen liefert, von *Koch* für eine Substanz gebraucht, welche gar keine Trimethyl-Ammoniumbasen enthält, während das Kephalin von *Cousin* das Cholin als einzige N-haltige Base enthält. Alle diese „Kephaline" sind nach verschiedenen Methoden dargestellt und haben nur das gemeinsam, daß sie in Äther leicht, in kaltem Alkohol schwer löslich sind, und daß das Atomverhältnis $N:P=1:1$ ist. Es soll daher zur Orientierung hier nur eine kurze Übersicht über die von *Thudichum* erhaltenen Edukte sowie über ihre Verteilung in den verschiedenen Lösungsmitteln gegeben werden.

Das Verhältnis der Anzahl Stickstoffatome zu der Anzahl der Phosphoratome gestattet, die Phosphatide in Gruppen einzuteilen.

Dies ist von praktischer Bedeutung insofern, als man die Darstellung und Reinigung von Phosphatiden durch Bestimmung ihres Stickstoff- und Phosphorgehaltes kontrollieren kann. Bei einem reinen Produkt muß sich das Verhältnis einem einfachen Wert (z. B. 1:1, 2:1 etc.) nähern.

Es sei deshalb hier darauf hingewiesen, daß man in der von *Neumann* ausgearbeiteten Säuregemischveraschung eine genaue und rasche

---

[1]) *Thudichum* definiert die Phosphatide als Derivate der Phosphorsäure, da er in dem Sphingomyelin ein Phosphatid gefunden hat, welches kein Glyzerin enthält. Siehe auch die Cerebrininphosphorsäure von *Bethe*.

Methode der Phosphorbestimmung zur Verfügung hat, wobei besonders darauf zu achten ist, daß man nicht mehr als 40 cm^3 des Säuregemisches zusetzt und daß vor der Fällung die Lösung einen Gehalt von 10% Ammoniumnitrat hat. Die Bestimmung wird beträchtlich beschleunigt[1], wenn man den Niederschlag von Ammoniumphosphomolybdat durch eine Filterröhre filtriert, in welche ein durchlöchertes Platinblech, welches mit Asbest oder Filtrierpapier bedeckt wird, eingeschmolzen ist. An Stelle des eingeschmolzenen Platinbleches kann man auch eine lose, gut passende, durchlöcherte Porzellanplatte verwenden. Das Filtrieren und Waschen nimmt dann nicht mehr als 5 Minuten in Anspruch.

Mit Wasser quellen die meisten Phosphatide und bilden eine kolloidale Lösung.

Phosphatide nach Thudichum.[2]

Monoamidomonophosphatide (N:P = 1:1).

	Berechnete Formel	Analysen in Prozenten: C	H	N	P	Cd	Cl
Lezithine	$C_{42}H_{82}NPO_8$	nicht angegeben					
Kephaline:							
Kephalin[3])	$C_{42}H_{79}NPO_{13}$	60·00	9·38	1·68	4·27	—	—
Oxykephalin[4])	$C_{42}H_{79}NPO_{14}$ (als Kadmiumsalz)	48·12	7·55	1·43	3·52	10·05	7·40
Peroxykephalin[5])	$C_{42}H_{79}NPO_{15}$	57·75	8·90	1·57	3·68	—	—
Myelin[6])	$C_{40}H_{75}NPO_{10}$	63·41	9·83	1·79	4·09	—	—
Paramyelin[7]) (Ochs)	$C_{38}H_{75}NPO_9$ (als Kadmiumsalz)	49·29	8·30	1·60	3·40	—	8·25

Monoamidodiphosphatide (N:P = 1:2).

—

Diamidomonophosphatide (N:P = 2:1).

	Berechnete Formel	C	H	N	P		
Amidomyelin[8])	$C_{44}H_{88}N_2PO_9$	Nicht angeführt					
Sphingomyelin[9]) (Ochs)	$C_{52}H_{104}N_2PO_9$	65·37	11·29	2·96	3·24	—	—
Apomyelin[10]) (Mensch)	$C_{54}H_{109}N_2PO_9$	67·01	11·35	3·00	3·23	—	—

Diamidodiphosphatide (N:P = 2:2).

	Formel	C	H	N	P	Pt	Cl
Assurin[11])	$C_{46}H_{94}N_2P_2O_9$ (als Platinsalz)	49·25	8·74	2·50	6·52	9·03	10·27
	$C_{47}H_{101}N_2P_2O_{11}$	49·01	8·85	2·30	6·06	8·57	9·55

[1]) *Aders Plimmer* and *Bayliss*, The separation of phosphorus from caseinogen by the action of enzymes and alkali. Journ. of Physiology. Vol. 33. p. 441 (1905/06).

[2]) *Thudichum*, Über die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. 1901.

[3]) l. c. S. 132.

[4]) l. c. S. 137.

[5]) l. c. S. 138.

[6]) l. c. S. 159.

[7]) l. c. S. 153.

[8]) l. c. S. 110, 164.

[9]) l. c. S. 170.

[10]) l. c. S. 170.

[11]) l. c. S. 175.

Systematische Extraktion des Nervengewebes nach Thudichum.

Das durch Erwärmen oder Behandlung mit kaltem Alkohol entwässerte Gehirn wird mit 85%igem Alkohol ausgekocht. Die ersten Auszüge lassen beim Abkühlen eine weiße Substanz ausfallen, von *Thudichum* „die weiße Materie“ genannt.

I. Die **„weiße Materie“** wird mit kaltem Äther ausgezogen.

In Lösung gehen: Cholesterin, Lezithin, Kephalin, Paramyelin, Myelin (teilweise).

Der Äther wird abdestilliert, der Rückstand mit einer alkoholischen Lösung von Bleiacetat versetzt und am Rückflußkühler mit kochendem Alkohol gekocht.

A. Kephalin und Myelin bilden in kochendem Alkohol unlösliche Bleisalze, welche durch Äther getrennt werden. Kephalinblei ist in Äther löslich, Myelinblei ist in Äther unlöslich.

B. Aus der heißen alkoholischen Lösung, welche alle übrigen Substanzen und etwas Myelinblei enthält, entfernt man das Cholesterin und das Myelinblei durch Abkühlen und Kristallisation. Lezithin und Paramyelin werden aus ihrer Lösung als Chlorkadmiumverbindungen gefällt und durch Benzol getrennt. Die Lezithinverbindung ist in kaltem Benzol löslich.

II. Die **„weiße Materie“** wird mit kochendem Äther ausgezogen.

In Lösung gehen phosphorfreie, stickstoffhaltige Fette: Krinosin, Bregenin.

III. Der Rückstand enthält Cerebroside, nämlich Phrenosin und Kerasin, und Phosphatide, nämlich Sphingomyelin und etwas Assurin.

Phrenosin und Kerasin werden durch wiederholtes Umkristallisieren getrennt. Aus den Mutterlaugen wird durch Chlorkadmium das Sphingomyelin und dann durch Platinchlorid das Assurin ausgefällt.

IV. Bearbeitung der Mutterlauge, aus welcher sich die **„weiße Materie“** abgesetzt hat.

Die Lösung wird durch Abdampfen des Alkohols konzentriert, wobei sich Lezithin, Paramyelin, Kephalin und Myelin absetzen. Die Substanzen werden, wie oben beschrieben, getrennt.

Für die Phosphatide des Herzmuskels ist gezeigt worden[1]), daß eine primäre Extraktion mit Alkohol sowie die Trennung durch Chlorkadmium Zersetzungen herbeiführt. Viele der von *Thudichum* beschriebenen sind daher jedenfalls sekundär entstandene Zersetzungsprodukte. Ferner ist am Protagon nachgewiesen worden, daß längere Behandlung mit heißem Alkohol, wie sie bei der oben behandelten Methode beim Auskochen des Gehirns und beim Abdampfen des Alkohols auf dem Wasserbad etc. unver-

[1]) *Erlandsen,* Untersuchungen über die lezithinhaltigen Substanzen des Myokardiums und der quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **51**. S. 71 (1907).

meidlich ist, das Protagon zersetzt.[1]) Es ist daher leicht erklärlich, warum bei dieser Extraktionsmethode *Thudichum* niemals eine Substanz von der konstanten Zusammensetzung des Protagons hat finden können. Die oben mit III bezeichnete Gruppe (Phrenosin, Kerasin, Sphingomyelin, Assurin) tritt an Stelle des durch heißen Alkohol zersetzten Protagons.

Die Natur der oben angegebenen Edukte bedarf daher dringend weiterer Untersuchungen mittelst weniger energischer Extraktions- und Trennungsmethoden.

Die Phosphatide von Zuelzer, Koch, Cousin und Bethe.

Durch eine einwandfreie, jede Zersetzung ausschließende Methode hat bisher nur *Zuelzer* Phosphatide aus dem Gehirn isoliert. Diese Phosphatide zeigen keinerlei Ähnlichkeit mit den von *Thudichum* isolierten Produkten. Dem Kephalin ähnliche, aber von ihm verschiedene Substanzen wurden von *Koch* und von *Cousin*, eine dem Sphingomyelin ähnliche Substanz wurde von *Bethe* erhalten. Ob bei der Darstellung dieser Produkte nicht Zersetzungen vorgekommen sind, ist fraglich.

Die Phosphatide von Zuelzer.[2])

Zuelzer hat einige Phosphatide auf folgende Weise erhalten: Das von Häuten befreite Gehirn wird zerschnitten und in Äther suspendiert, in ähnlicher Weise wie oben für die *Baumstark*sche Entwässerungsmethode angegeben ist. Es bildet sich unter dem Äther eine blutgefärbte, wässerige Lösung, welche zusammen mit dem Äther abgegossen und im Scheidetrichter getrennt wird. Die Ätherextraktion wird mit frischem Äther fortgesetzt, bis der Äther beim Verdunsten keinen Rückstand hinterläßt. Die vereinigten ätherischen Auszüge werden durch Vakuumdestillation oder durch Verdunsten bei Zimmertemperatur eingeengt, wobei ein reiner phosphorhaltiger Körper ausfällt, der von *Zuelzer* als Protagon angesprochen wird. Derselbe hat die Zusammensetzung:

C	H	N	P	S
66·9	11·59	3·30	1·01	0

Der zu hohe Stickstoffgehalt und das Fehlen von Schwefel zeigt jedoch, daß die Substanz jedenfalls kein reines Protagon darstellt. Weitere Angaben über den Körper liegen nicht vor.

Die von dieser Substanz abfiltrierte ätherische Lösung wird mit überschüssigem Aceton versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Der abfiltrierte Niederschlag erweist sich nach sorgfältigem Waschen mit Aceton als völlig frei von Cholesterin, welches im Filtrat und der Waschflüssigkeit in Lösung verbleibt.

---

[1]) *Wilson* and *Cramer*, On protagon etc. l. c.

[2]) *Zuelzer*, Über die Behandlung des Lecithins und anderer Myelinsubstanzen aus Gehirn- und Eigelbextrakten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **27**. S. 255 (1899).

Der Niederschlag wird mit Äther behandelt, wobei jetzt ein Teil als unlöslich zurückbleibt. (Auch diese Substanz wurde auf Grund des Stickstoffgehaltes 2·85% und der Kristallform als Protagon angesprochen.)

Der ätherlösliche Teil des Acetonniederschlages wird mit Alkohol versetzt, wobei eine Fällung auftritt. Die Mengenverhältnisse des Alkohols zu der ätherischen Lösung sind von *Zuelzer* nicht angegeben. In dem alkoholischen Filtrat befindet sich eine lecithinartige Substanz, die nicht weiter untersucht wurde, als daß ein Platinsalz gebildet wurde, welches 10·7% Pt enthielt. Aus reinem Ochsengehirn konnten ungefähr 3 *g* des aus der ätherischen Lösung durch Alkohol erfolgten Niederschlages erhalten werden. Dieser Niederschlag stellt ein Gemisch von wenigstens zwei Phosphatiden dar, die sich hauptsächlich durch ihren N-Gehalt unterscheiden. Der Niederschlag ist in Äther, Benzol und Chloroform löslich; unlöslich in Alkohol und Aceton und stellt eine weißliche Masse dar, die sich am Licht gelb färbt. Beim Erhitzen zersetzt er sich bei 128° ohne zu schmelzen. Der Niederschlag wird durch wiederholtes Lösen in Äther, Fällen mit Aceton oder Alkohol gereinigt.

Eine teilweise Trennung kann in der Weise bewirkt werden, daß man den mit Alkohol oder Aceton erhaltenen Niederschlag längere Zeit unter Alkohol oder Aceton stehen läßt, abfiltriert und an der Luft trocknen läßt. Ein Teil des Niederschlages ist dann nicht mehr leicht in Äther löslich, behält jedoch seine Löslichkeit in Chloroform und Benzol. Dieser ätherunlösliche Teil, welcher nur ungefähr den zehnten Teil des Niederschlages darstellt, enthält die stickstoffreiche Substanz und gibt die folgenden Analysenzahlen:

C	H	N	P
55·52%	8·74%	10·97%	(2·52% berechnet)

Für den ätherlöslichen Teil wird die folgende Zusammensetzung aus den Analysen des Gemisches und der Analyse des ätherunlöslichen Teiles berechnet:

C	H	N	P
60·2%	9·8%	3·8%	2·6%

Bei dieser Darstellungsmethode ist eine Zersetzung wohl als ausgeschlossen zu betrachten. Dagegen ist die Einheitlichkeit der isolierten Substanzen wohl zweifelhaft. Dieselben sind jedenfalls mit keiner der von *Thudichum* beschriebenen Substanzen identisch und das Verhältnis N : P ist ein ganz außergewöhnliches, besonders für den ätherunlöslichen Körper, der 10 N auf 1 P enthält, während bei dem ätherlöslichen Körper 3 N auf 1 P kommen.

Das Phosphatid von Koch (Kephalin).[1]

Der zerkleinerte Gehirnbrei wird durch 8stündiges Kochen mit einem gleichen Gewicht von Aceton entwässert. Nach dem Erkalten wird filtriert,

[1]) *W. Koch*, Zur Kenntnis des Lecithins, Kephalins und Cerebrins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36. S. 134 (1902).

der Rückstand durch Erwärmen auf 50° vom Aceton befreit und die Gehirnsubstanz zweimal je 3 Tage lang mit kaltem Äther ausgezogen (jedesmal 700 *cm*³ Äther auf 1 *kg* des frischen Materials). Die ätherischen Auszüge werden vereinigt und in einem hohen, offenen Gefäße bis zur Verdunstung auf ein Viertel ihres Volumens stehen gelassen. Ein weißer Niederschlag setzt sich ab, von dem die ätherische Lösung mit der Pipette abgehoben wird.

Die ätherische Lösung wird mit dem 4—5fachen Volumen Alkohol versetzt (1·5 *kg* Alkohol auf 350 *cm*³ Ätherlösung), wodurch das Kephalin ausgefällt wird. Zur Reinigung wird dasselbe fünfmal mit kochendem Alkohol ausgezogen, in Äther gelöst, mit Aceton gefällt, wieder in Äther gelöst und die trübe Lösung in einem hohen, geschlossenen Gefäße eine Woche lang stehen gelassen. Nachdem die Lösung sich geklärt hat, wird sie vorsichtig abgegossen und verdunstet. Der harzige Rückstand wird zweimal aus heißem Essigester umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute 10 *g* aus 1000 *g* Gehirn.

Eigenschaften. Das so erhaltene Kephalin ist eine braune, sehr hygroskopische Substanz; mit Wasser quillt es wie Lecithin. Es ist löslich in kaltem Äther, Eisessig, Chloroform und Schwefelwasserstoff, unlöslich in heißem wie in kaltem Alkohol und in Aceton. Durch Zusatz einer geringen Menge Salzsäure erhöht sich die Löslichkeit im Alkohol. In heißem Essigester ist es löslich und scheidet sich beim Abkühlen ab. Beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure auf 240° wird alles Methyl abgespalten, woraus geschlossen wird, daß nur ein an Stickstoff gebundenes Methyl im Molekül vorhanden ist. Die Kephaline sollen sich darin von den Lecithinen unterscheiden, welche 3 Methylgruppen aus Stickstoff haben und 1 Molekül bei 240°, die anderen beiden bei 300° abspalten (siehe quantitative Bestimmung der Phosphatide). Bei der Verseifung mit Barytwasser wurde eine Base erhalten, die nicht mit dem Cholin identisch war, aber nicht genügend rein erhalten wurde. Dieses Kephalin soll ein Dioxystearylmonomethyllecithin sein.

Analysen	C	H	N	P	CH_3
Berechnet für $C_{42}H_{82}NPO_{13}$	60·06	9·77	1·67	3·70	1·78
Gefunden	59·50	9·80	1·75	3·83	1·72

Die von *Koch* erhaltenen Resultate über das Verhalten der in Kephalin enthaltenen Methylgruppen stehen in einem merkwürdigen Widerspruch zu den Beobachtungen von *Cousin* (siehe unten), der aus dem Kephalin allen Stickstoff als Cholin abspalten konnte, so daß demzufolge das Kephalin wie das Lecithin drei Methylgruppen aus Stickstoff enthalten sollte. Möglicherweise sind diese beiden Kephaline nicht identisch.

Das Phosphatid von Cousin[1] (Kephalin).

Entwässertes Gehirn wird mit Chloroform ausgezogen, die Lösung von Chloroform durch Abdampfen befreit und aus dem Rückstand das

[1]) *Cousin*, Sur les acides gras de la céphaline. Journal de Pharmacie et de Chimie. T. **24**. p. 101 (1906).

Cholesterin durch kochenden Aceton ausgezogen. Der cholesterinfreie Rückstand wird mit dem doppelten Gewicht Äther behandelt, wobei bis auf einen geringen Rückstand alles in Lösung geht. Aus der ätherischen Lösung wird durch das 4—5fache Volumen Alkohol ein Phosphatid niedergeschlagen, während Lecithin in Lösung bleibt. Das rohe Phosphatid wird durch Lösen in Äther und Fällung durch Alkohol, sowie durch Behandlung mit kochendem Alkohol (Einzelheiten sind nicht angegeben) gereinigt.

Ausbeute: 50 *g* aus 1000 *g* Gehirn.

Eigenschaften. Das so erhaltene Kephalin ist eine wachsartige gelbe Masse, die sich nach einiger Zeit rotbraun färbt. Es ist unlöslich in Aceton, kaum löslich in Essigäther und kaltem Alkohol, löslich in warmem Alkohol.

Analysen: N 1·84% P 3·8%.

Zu der Hydrolyse durch Säuren und Alkalien wurden neben Glycerophosphorsäure flüssige ungesättigte Fettsäuren, die zur Linolsäurereihe gehören, und feste gesättigte Fettsäuren, die zum größten Teil aus Stearinsäure bestehen, erhalten. Ölsäure wurde nicht gefunden. Der gesamte Stickstoff wird als Cholin abgespalten.

Cholin ist die einzige stickstoffhaltige Base, die bei der Verseifung durch Barytwasser oder bei der Hydrolyse durch Salzsäure gefunden wurde.[1]) Die von *Thudichum* und *Koch* erhaltenen basischen Produkte sollen Zersetzungsprodukte sein, welche durch zu lange Einwirkung des Alkalis aus dem Cholin entstanden sind. Es ist jedoch auch möglich, daß das von *Cousin* isolierte Phosphatid ein reineres oder weniger zersetztes Produkt darstellt.

Das Bethesche Phosphatid und die Bethesche Kupfermethode.[2])

Zerkleinertes Gehirn wird unter Zusatz von wenig Wasser mit Kupferchlorid angerührt, einige Tage stehen gelassen und so lange Kupferchlorid zugefügt, bis der Brei auch nach längerem Stehen eine deutlich grüne Farbe behält. Dann wird Kalilauge bis zur deutlichen Violettfärbung zugefügt und stehen gelassen. Nach 24 Stunden wird Alkohol zugesetzt und gerührt, wobei eine flockige Abscheidung erfolgt, die bei weiterem Rühren zu einem Kuchen verklebt. Der Kuchen wird mit Salzsäure angerührt, eventuell Kupferchlorid zugesetzt und wie vorher mit Kalilauge und Alkohol behandelt, wobei Cholesterin und einige Phosphate in Lösung gehen. Diese Behandlung wird noch zwei- bis dreimal wiederholt. Dann wird der Kuchen mit Essigsäure angesäuert, mit Alkohol entwässert der

---

[1]) *H. Cousin*, Sur la nature des produits azotés formés dans la décomposition de la céphaline. Journal de Pharmacie et de Chimie. T. 25. p. 177 (1907). — Derselbe, Sur la nature des produits azotés obtenus dans la saponification. Comptes rendus de la Soc. de Biologie. T. 62. p. 238 (1907).

[2]) *Bethe*, Über einige Edukte des Pferdegehirns. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie. Bd. 48. S. 73 (1902).

Alkohol abgepreßt und die Masse mit warmem Chloroform extrahiert. Die dunkelgrüne Lösung wird stark eingeengt und tropfenweise in Äther eingetragen, wobei ein Niederschlag erfolgt, den man im Eisschrank sich absetzen läßt. Die über dem Niederschlag stehende Lösung wird abgehebert und darf auf Zusatz von Äther keinen Niederschlag geben.

Der Niederschlag wird in Äther gewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos abläuft, in wenig heißem Chloroform gelöst und tropfenweise in heißen Alkohol eingetragen, wobei ein grüner Niederschlag ausfällt, der heiß abfiltriert wird.

Niederschlag. Durch wiederholtes Lösen in Chloroform und Fällen mit Alkohol wird der Niederschlag gereinigt, wodurch er schließlich in Chloroform unlöslich wird. Die Substanz wird dann in heißem Alkohol aufgeschwemmt und vorsichtig Salzsäure zugesetzt, bis der Körper in Lösung geht. Beim Erkalten scheiden sich Kristalle ab, die durch Waschen mit verdünntem Alkohol vom Kupferchlorid befreit werden. Zur weiteren Reinigung wird die Substanz aus heißem Alkohol durch Baryt als Baryumsalz ausgefällt, heiß abfiltriert und mit heißem Alkohol gewaschen, durch Kohlensäure zersetzt und aus Alkohol umkristallisiert. Die Substanz muß gereinigt werden, bis dieselbe keinen Phosphor mehr enthält. Die Substanz ist das dem Homocerebrin ähnliche oder damit identische Amido-Cerebrininsäureglycosid (siehe oben unter Cerebrosiden).

Filtrat. Das vom Niederschlag heiß abfiltrierte Filtrat scheidet beim Erkalten einen dicken Kristallbrei aus, der in Alkohol heiß gelöst wird. Zusatz von wässeriger Barytlösung fällt ein schmieriges zusammenklumpendes Barytsalz, von welchem die Lösung heiß abfiltriert wird. Die beim Erkalten sich ausscheidende Substanz wird in heißem Alkohol gelöst, von Baryt durch Schwefelsäure befreit und heiß filtriert. Die beim Erkalten sich ausscheidenden Kristalle werden durch mehrfaches Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt. Die so erhaltene Substanz ist die dem Sphingomyelin ähnliche Cerebrininphosphorsäure.

Aus dem Barytsalz kann durch Aufschwemmen in warmem Alkohol und Zusatz von Schwefelsäure eine Substanz freigemacht werden, die durch Lösen in Chloroform und Fällen mit Äther sowie durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt werden kann. Dieselbe gehört zu den stickstoffhaltigen, phosphorfreien Lipoidsubstanzen und erhielt den Namen Phrenin.

Die Ausbeuten der Cerebrininphosphorsäure und des Phrenin schwanken. Das erstere wurde nur in geringen Mengen erhalten. Das letztere wurde überhaupt nicht regelmäßig gefunden, während gelegentlich 1·5 *g* und 2·5 *g* aus 1 *kg* Gehirn erhalten wurde. Dies deutet wohl darauf hin, daß wir es beim Phrenin jedenfalls mit einem Zersetzungsprodukt zu tun haben. *Koch*[1]) erhielt in der Tat eine ähnliche Substanz durch Kochen von Cerebrin mit verdünnter Salzsäure. Es erscheint daher sehr fraglich, ob

[1]) *Koch,* Methods for the quantitative analysis of the brain and cord. American Journal of Physiology. T. **11.** p. 310 (1904).

nicht auch die Cerebrininphosphorsäure als ein Zersetzungsprodukt anzusehen ist; besonders da dasselbe nur in geringer Menge erhalten wurde. Der Wert der ganzen Methode ist daher zweifelhaft.

Cerebrininphosphorsäure kristallisiert aus Alkohol in kleinen, breiten, gebogenen Nadeln. Es ist schwer löslich in kaltem Äther, leichter löslich in warmem Äther, sehr leicht löslich in heißem Alkohol und Chloroform.

Analysen (Mittel)	C	H	N	P	N:P	Schmelzpunkt
	71·13	12·08	2·97	2·71	2:1	161—162°

Beim Kochen mit Kalilauge wird Ammoniak und Phosphorsäure abgespalten. Glyzerinphosphorsäure ist nicht vorhanden. Beim Kochen mit Salzsäure sollen neben Galaktose und Phosphorsäure noch Cerebrininsäure und Amidocerebrininsäure gebildet werden. Die Spaltungsprodukte wurden jedoch nicht genauer identifiziert.

Phrenin kristallisiert aus Alkohol in langen verfilzten Nadeln. Es ist unlöslich in Äther. Beim Kochen mit Kalilauge wird Ammoniak abgespalten. Durch Kochen mit Säuren wird keine reduzierende Substanz abgespalten.

Analysen:	C	H	N	Schmelzpunkt
	71·90	11·95	1·49	96—101°

Quantitative Bestimmung der Phosphatide nach Koch und Woods.[1])

Diese Methode beruht auf Extraktion der Phosphatide mit Alkohol und Äther und Trennung der Lecithine von den Kephalinen durch alkoholische Bleiacetatlösung, wodurch fast ausschließlich Kephalin niedergeschlagen wird. Vor der Behandlung mit Bleiacetat werden die Phosphatide von unorganischen Phosphaten und phosphorhaltigen Extraktivstoffen getrennt, indem sie aus der wässerigen, sauren Lösung durch Chloroform niedergeschlagen werden. Die Kephaline und Lecithine werden schließlich durch Phosphoranalysen bestimmt. Eine besondere Korrektion muß noch angebracht werden, da die Kephaline und Lecithine mit einem schwefelhaltigen Körper behaftet sind, der ebenfalls Phosphor enthält. Eine Schwefelbestimmung ist daher erforderlich. (Bei anderen als nervösen Geweben ist diese Korrektion nicht erforderlich.)

Gegen die Berechnung der Phosphatide aus Phosphorbestimmungen ist jedoch einzuwenden, daß die Versuche von *Erlandsen*[2]) erwiesen haben, daß in den Geweben Phosphatide von sehr verschiedenem Phosphorgehalt vorkommen, welche bei der Berechnung nach *Koch* und *Woods* nicht berücksichtigt werden. Tatsächlich hat *Erlandsen*[2]) allein aus dem Äther-

---

[1]) *W. Koch* and *H. S. Woods*, The quantitative estimation of the lecithans. Journ. of Biological Chemistry. Vol. 1. p. 204 (1906).

[2]) *Erlandsen*, Untersuchungen über die lezithinartigen Substanzen des Myokardiums und der quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **51**. S. 96 (1907).

extrakt des Herzmuskels mehr Phosphatide isolieren können, als *Koch* und *Woods* für den gesamten Herzmuskel fanden. Solange unsere Kenntnisse der Gehirnphosphatide so unzulänglich und voll von Widersprüchen sind, müssen Versuche, dieselben quantitativ zu bestimmen, verfrüht erscheinen. Man sollte sich damit begnügen, den in Lipoidform gebundenen Phosphor zu bestimmen und davon den Phosphor, der in dem, einer quantitativen Bestimmung zugänglichen, Protagon gebunden ist, abziehen. Auf diese Weise hat *Noll* [1]) gezeigt, daß nur etwa 18% des Lipoidphosphors auf die Rechnung der im Protagon gebundenen Phosphatidgruppe kommen.

Da die von *Koch-Woods* angewendete Technik der Extraktion der Lipoide sehr zweckmäßig erscheint und sich auch für die Bestimmung des Lipoidphosphors verwenden läßt, so ist die ganze Methode hier im einzelnen angegeben. Die Trennung der Kephalinen von den Lecithinen sowie die Berechnung müssen jedoch wohl verworfen werden.

Methode.

Apparat. Der Extraktionsapparat besteht aus einem 250 cm^3 fassenden Kolben mit Rückflußkühler, der eine eingeschliffene Glasverbindung hat. An der Kühlröhre ist mittelst Platindrähten ein 15 cm^3 fassender Goochtiegel so aufgehängt, daß er ungefähr 2—3 *cm* vom Boden der Fläche sich befindet. Der Boden des Goochtiegels ist mit Filtrierpapier oder Asbest bedeckt. Der Apparat wird auf dem Wasserbad oder Dampfbad erwärmt.

Extraktion. Das zu analysierende Gewebe wird von Blut befreit, zerkleinert, etwa 10 *g* in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und 60 cm^3 absoluter Alkohol zugesetzt. (Wird die Analyse nicht sofort vorgenommen, so wird das Material in eine gut schließende Flasche gewogen und mit 60 cm^3 absolutem Alkohol versetzt.) Der Kolben wird eine halbe Stunde lang bis fast zum Kochen erwärmt und der Inhalt dann in den Goochtiegel übergeführt, so daß das Filtrat in den Kolben des Extraktionsapparates abfließt. Das Material wird 8 Stunden lang extrahiert. Nötigenfalls muß noch mehr Alkohol zugesetzt werden. Dann wird der in dem Kolben befindliche Alkohol vorsichtig verdunstet, Äther zugesetzt und mit Äther 8 Stunden lang extrahiert. Der im Goochtiegel befindliche Rückstand wird dann im Mörser zerrieben, wieder quantitativ in den Tiegel zurückgebracht und 6 Stunden lang mit Alkohol und 4 Stunden lang mit Äther extrahiert und der Alkohol und Äther vorsichtig abgedunstet.

Emulsierung und Niederschlagen der Phosphatide. Der vom Alkohol und Äther völlig befreite Rückstand wird in dem Extraktionskolben mit 40 cm^3 destilliertem Wasser versetzt und stehen gelassen, aber nicht länger als 24 Stunden. Der Rückstand und die wässerige Lösung werden dann in einen 100 cm^3-Meßkolben übergeführt, so daß der Kolben ungefähr 90 cm^3 enthält. Ist viel Fett zugegen, so wird die Überführung

[1]) *Noll*, Über die quantitativen Beziehungen des Protagons zum Nervenmark. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **27**. S. 370 (1899).

etwas erschwert und kann durch Zufügen von 1—2 *cm*³ Chloroform und Schütteln erleichtert werden. Der Meßkolben wird kräftig geschüttelt und die Flüssigkeit mit 1—2 *cm*³ konzentrierter Salzsäure und 2—4 *cm*³ Chloroform versetzt, wieder geschüttelt und bis zur Marke aufgefüllt und stehen gelassen, bis der sich ausscheidende Niederschlag von Lipoiden (Phosphatiden, Cholesterin, Cerebrin etc.) sich abgesetzt hat, was 1—14 Tage dauern kann. Dabei ist zu beachten, daß das Absetzen verzögert wird, wenn der zur Extraktion verwendete Alkohol nicht völlig entfernt worden ist. Ferner muß genügend Säure und Chloroform zugesetzt werden, um völlige Abscheidung und Klärung zu erreichen. (Je mehr Fett vorhanden ist, um so mehr Chloroform und Säure ist erforderlich.)

Trennung der Kephaline. Nach dem Absetzen des Lipoidniederschlages wird die klare überstehende Flüssigkeit durch ein 6—8 *cm* aschefreies Filter dekantiert und der Niederschlag im Kolben mit 10 *cm*³ Wasser, dem 0·1 *cm*³ starker Salzsäure zugesetzt ist, und durch Schütteln gewaschen. Nach dem rasch erfolgenden Absetzen des Niederschlages wird das Waschwasser wieder durch das Filter abgegossen. Der Niederschlag wird im Kolben in heißem Alkohol gelöst und in einen 300—500 *cm*³ fassenden, langhalsigen Jenakolben übergeführt. Der Extraktionskolben und das Filter werden mit heißem Alkohol wiederholt gewaschen und schließlich mit einer geringen Menge Äther ausgespült. Alkohol wird zugesetzt, so daß das Volumen der Lösung ungefähr 100 *cm*³ beträgt und die Lösung zur Entfernung des Äthers auf dem Wasserbad erhitzt. Dann werden 5 *cm*³ einer heiß gesättigten alkoholischen Lösung von Bleiacetat unter beständigem Schwenken zugesetzt, das Gemisch 10 Minuten lang auf dem Wasserbad erwärmt, 1 *cm*³ einer 50%igen Ammoniaklösung zugegeben und nach kräftigem Schütteln noch 5 Minuten lang erwärmt. Dann läßt man das Gemisch 24 Stunden lang stehen.

Die klare überstehende Flüssigkeit wird dann durch ein kleines, aschefreies Filter in einen gleich großen, langhalsigen Jenakolben abgegossen, der Niederschlag mit heißem Alkohol gewaschen, die Waschungen mit dem Filtrat vereinigt und der Alkohol auf dem Wasserbad aus dem Kolben abgedampft. Der Rückstand soll die Lecithine enthalten.

Der auf dem Filter befindliche Niederschlag wird durch Durchstoßen und Auswaschen des Filters mit einer möglichst kleinen Menge heißen Wassers mit der Hauptmenge des Niederschlages vereinigt. Das Wasser wird durch vorsichtiges Erhitzen über freier Flamme abgedampft, wobei ein Verkohlen des Niederschlages vermieden werden muß. Der Rückstand soll die Kephaline darstellen.

Die Phosphorbestimmung der Lecithine und Kephaline wird nach der *Neumann*schen Methode ausgeführt. Dabei ist zu beachten, daß von dem gebildeten Bleisulfat abfiltriert werden muß. Der abgesaugte Niederschlag wird mit möglichst geringen Mengen verdünnter Schwefelsäure (1 Teil Schwefelsäure und 20 Teile Wasser) sorgfältig gewaschen und die Waschungen mit dem Filtrat vereinigt.

Berechnung. Die zur Lösung des phospho-molybdeinsauren Niederschlages nötige Menge $\frac{N}{2}$-Natronlauge wird mit 0·553 multipliziert. Dies gibt die gefundene Menge Phosphor, welche, nach der Korrektion mit 25·75 multipliziert, die Menge Lezithin resp. Kephalin angibt. Das Molekulargewicht der Phosphatide wird zu 800 angenommen.

Der für Phosphor gefundene Wert muß durch eine Schwefelbestimmung sowohl der Kephaline wie der Lecithine korrigiert werden. Die Bestimmung erfolgt durch Schmelzen mit einer Mischung von 7 Teilen Natriumkarbonat und 1 Teil Kaliumnitrat. Die geschmolzene Masse wird in Wasser gelöst, mit Salpetersäure angesäuert und mit 1%iger Baryumnitratlösung gefällt. Für je 2 Moleküle S soll je 1 Molekül Phosphor abgezogen werden. Diese Berechnung setzt die Existenz eines hypothetischen Cerebrosulfatids voraus. Es ist bereits oben bei den Cerebrosulfatiden ausgeführt worden, daß eine solche Annahme vorläufig nicht gerechtfertigt ist.

Quantitative Bestimmung der Phosphatide nach Koch. [1]

Eine andere Methode beruht auf der quantitativen Bestimmung der mit Jodwasserstoff abspaltbaren Methylgruppe nach der Methode von *Herzig* und *Meyer*. Die nur eine Methylgruppe enthaltenden Kephaline (Kephalin, Myelin) spalten dasselbe quantitativ unter 240° ab. Die drei Methylgruppen enthaltenden Lecithine spalten ein Methyl quantitativ unter 240° und zwei Gruppen quantitativ zwischen 240° und 300° ab. Das abgespaltene Methyljodid wird in einer Silbernitratlösung aufgefangen und das ausgefällte Silberjodid als solches gewogen. Zur Ausführung der Bestimmung wird der wie oben erhaltene Lipoidniederschlag zuerst langsam mit Ammoniumjodid und Jodwasserstoffsäure (spez. Gew. 1·5) im Sandbad erhitzt. Bei ungefähr 160° trübt sich die Silbernitratlösung. Nach zirka 20 Minuten weiteren Erhitzens hat sich der Niederschlag abgesetzt. Wenn die Temperatur 240° erreicht hat, wird eine frische Silbernitratlösung vorgelegt und die Temperatur weiter gesteigert. Bei ungefähr 280° tritt wieder Trübung auf. Die Temperatur wird langsam bis auf 320° gebracht, wodurch alles Methyl abgespalten wird.

Das über und unter 240° ausgefällte Silberjodid wird getrennt bestimmt. Die in der Vorlage befindliche Silbernitratlösung wird mit dem Niederschlag in das dreifache Volumen Wasser gegossen, auf dem Wasserbad vom Alkohol, mit Salpetersäure angesäuert, filtriert und nach dem Trocknen gewogen.

Die erste Bestimmung unter 240° gibt mit 3·325 multipliziert die Gesamtmenge der Phosphatide. Die zweite Bestimmung bis 240°—300° gibt mit 1·661 multipliziert die Menge der Lecithine. Die Differenz der

---

[1] *Koch*, Methods for the quantitative chemical analysis of the brain and cord. Amer. Journ. of Physiol. Vol. **11**. p. 333 (1904).

Werte gibt die Menge der Kephaline und Myeline. Man kann das größere Molekulargewicht der Kephaline und Myeline derart korrigieren, daß man den gefundenen Wert durch 0·925 dividiert.

Die Diamidomonophosphatide und die Diamidodiphosphatide werden überhaupt nicht berücksichtigt.

Durch die kürzlich veröffentlichten Befunde von *Cousin* (siehe oben unter Kephalin), der aus dem Kephalin allen Stickstoff als Cholin abspalten konnte, ist ferner das ganze Prinzip dieser Methode erschüttert worden. Die Methode war schon vorher von *Koch* selbst zugunsten der Methode von *Koch* und *Woods* aufgegeben worden, die jedoch aus oben angegebenen Gründen ebenfalls nicht einwandfrei ist.

Quantitative Bestimmung der Cerebroside nach Koch.[1]

Diese Methode ist eine Modifikation der ursprünglich von *Noll* ausgearbeiteten Methode zur quantitativen Bestimmung des Protagons im nervösen Gewebe. Sie beruht darauf, daß sämtliche Cerebroride beim Kochen mit verdünnten Säuren Galaktose abspalten, die durch ihr Reduktionsvermögen quantitativ bestimmt werden kann. Bestimmungen über die Menge Galaktose, welche von reinem Cerebron abgespalten werden, gestatten die Aufstellung einer Tabelle, welche die einer gefundenen Menge Kupferoxydul entsprechende Menge Cerebron gibt. Der so gefundene Wert gibt die Gesamtmenge der Cerebroside ausgedrückt als Cerebron.

Von den Gesamtcerebrosiden läßt sich ein Teil getrennt bestimmen, nämlich die Cerebrinsäuren, welche in heißem Alkohol unlösliche Bleisalze geben und sich so vom Cerebron, Cerebrin, Kerasin etc. unterscheiden. Die Differenz der Kupferbestimmungen für die Gesamtcerebrosiden und die Cerebrinsäuren gibt die dem Cerebron, Cerebrin, Homocerebrin etc. entsprechende Menge Kupferoxydul. Da die verschiedenen Cerebroside sich in ihrer chemischen Zusammensetzung sehr ähnlich sind und ungefähr die gleiche Menge Galaktose abspalten, so kann man die gefundene Menge Kupferoxydul, ohne große Fehlerquellen einzuführen, auf Cerebron umrechnen.

Die Ausführung der Bestimmung ist wie folgt:

G e s a m t c e r e b r o s i d e. Nachdem man in der für die Phosphatidbestimmung angegebenen Weise den Lipoidniederschlag erhalten hat und die überstehende Flüssigkeit durch Filtrieren und Waschen entfernt hat, wird der Rückstand in heißem Alkohol gelöst, in einen 200 cm^3 fassenden Kolben übergeführt und der Alkohol abgedampft. Der Rückstand wird am Rückflußkühler 20 Stunden lang mit 1%iger Salzsäure gelinde gekocht. Die Flüssigkeit wird in einen Maßkolben übergeführt und mit einer gesättigten Natriumsulfatlösung versetzt, bis sich die Flüssigkeit klar und schnell filtrieren läßt. Ein abgemessener Teil des klaren Filtrates wird mit Natron-

[1]) *W. Koch,* Methods for the quantitative chemical analysis of the brain and cord. American Journal of Physiology. Vol. 11. p. 303 (1904).

lauge neutralisiert und mit 10—20 cm^3 kalter *Fehling*scher Lösung versetzt, wobei die Lösung klar bleiben muß. Die Lösung wird auf dem Wasserbade erwärmt, über freier Flamme zum Kochen erhitzt und dann mehrere Stunden lang auf dem Wasserbade erwärmt, so daß sich ein grobkörniger, ziegelroter Niederschlag bildet. Es ist unbedingt nötig, mit einem großen Überschuß *Fehling*scher Lösung zu arbeiten. Die über dem Niederschlag von Kupferoxydul stehende Flüssigkeit muß ihre tiefdunkle Farbe beibehalten; nimmt sie eine grünliche Färbung an, so ist zu wenig *Fehling*sche Lösung verwendet worden. Die Lösung soll nicht mehr als 0·2% Zucker enthalten. Das abgeschiedene Kupferoxydul wird auf einen Goochtiegel gesammelt, mit heißem Wasser gewaschen, getrocknet, geglüht und gewogen. Aus der so erhaltenen Menge Kupferoxydul läßt sich die Menge der Gesamtcerebroside, berechnet für Cerebron, aus der folgenden Tabelle ablesen. Diese Tabelle beruht auf Bestimmungen der Galaktosemengen, welche aus dem *Koch*schen Cerebrin (siehe dieses) durch Salzsäure abgespalten werden.

Tabelle zur Berechnung des Cerebrons aus gefundenen Mengen Kupferoxyd (gilt auch für Cerebrin, Homocerebrin und Cerebrinacide).

Cu O *mgr*	Cerebron *mgr*	Cu O *mgr*	Cerebron *mgr*	Cu O *mgr*	Cerebron *mgr*	Cu O *mgr*	Cerebron *mgr*
6	18·4	27	65·9	48	113·6	69	160·9
7	20·7	28	68·2	49	115·8	70	163·2
8	23·0	29	69·5	50	118·0	71	165·5
9	25·3	30	72·8	51	120·2	72	167·8
10	27·6	31	75·1	52	122·5	73	170·1
11	29·9	32	77·4	53	124·7	74	172·4
12	32·2	33	79·6	54	127·0	75	174·7
13	34·4	34	81·9	55	129·2	76	177·0
14	36·7	35	84·1	56	131·5	77	179·3
15	38·9	36	86·4	57	133·7	78	181·5
16	41·2	37	88·6	58	136·0	79	183·8
17	43·4	38	90·8	59	138·2	80	186·1
18	45·7	39	93·1	60	140·5	81	188·4
19	47·9	40	95·4	61	142·7	82	190·7
20	50·2	41	97·6	62	145·0	83	192·9
21	52·4	42	99·9	63	147·3	84	195·2
22	54·7	43	102·3	64	149·6	85	197·5
23	56·9	44	104·6	65	151·8	86	199·8
24	59·2	45	106·8	66	154·0	87	202·1
25	61·4	46	109·1	67	156·3	88	204·4
26	63·7	47	111·3	68	158·6	89	206·7

Cerebrinsäuren. Eine abgewogene Menge des Gewebes wird mit Alkohol und Äther extrahiert, wie für die Phosphatidbestimmung angegeben ist. Nach dem Verdunsten des Äthers wird die warme alkoholische Lösung mit etwas Ammoniak versetzt und ein Überschuß einer alkoholischen Bleiacetatlösung zugefügt. Der Niederschlag wird in einem großen Goochtiegel gesammelt und mit heißem Alkohol behandelt, bis sich nichts mehr löst. Der im Goochtiegel befindliche Rückstand wird dann in der für die

Gesamtcerebroside angegebenen Weise mit verdünnter Salzsäure zersetzt. Die so erhaltene Menge Kupferoxydul gibt die Menge der vorhandenen Cerebrinsäuren an, die aus der obigen Tabelle, als Cerebron berechnet, abgelesen werden kann. Die Menge der vorhandenen Cerebrinsäuren ist so gering, daß die Berechnung als Cerebron keinen großen Fehler einführt. Es sei hier noch einmal daran erinnert, daß dieselben vielleicht sekundäre Zersetzungsprodukte sind, so daß in diesem Falle ihre besondere Bestimmung unnötig wird.

Cerebron, Kerasin etc. wird aus der Differenz der Kupferoxydulbestimmung für die Gesamtcerebroside und Cerebrinsäure mittelst obiger Tabelle berechnet.

Quantitative Bestimmung des Protagons.

Bei der quantitativen Bestimmung der Phosphatide und Cerebroside wird das Protagon nicht berücksichtigt, sondern die im Protagon enthaltenen Phosphatide und Cerebroside werden als solche bestimmt. Dagegen wäre nichts einzuwenden, wenn die Phosphatide wohl definierte und durchweg in reinem Zustand isolierte Substanzen wären. Dies ist jedoch durchaus nicht der Fall, und es ist oben ausgeführt worden, daß die bisher ausgearbeiteten Methoden zur Bestimmung der Phosphatide infolge unserer lückenhaften Kenntnisse der Phosphatide ganz unzuverlässig sind. Dagegen haben wir im Protagon eine sehr scharf definierte und genau untersuchte Substanz, die sich daher besonders gut zur quantitativen Bestimmung eignet. Nun enthält das Protagon einen Teil der im Nervengewebe vorhandenen Phosphatidgruppen, die schwefelhaltige Gruppe und, wie weiter unten ausgeführt wird, entweder einen Teil oder sämtliche Cerebrosidgruppen. Eine quantitative Bestimmung des Protagons gibt daher Aufschluß über einen Teil der Lipoidsubstanzen. Bestimmt man zugleich den Phosphorgehalt der alkohol-ätherlöslichen Substanzen und berechnet man die der gefundenen Protagonmenge entsprechende Menge Phosphor, so gibt die Differenz die Menge Phosphor, welche als freies Phosphatid, nicht im Protagon gebunden, vorkommt.

[Für die quantitative Bestimmung des Protagons kommt die Streitfrage, ob das Protagon eine einheitliche Substanz oder eine Mischung von Phosphatiden, Cerebrosiden und Cerebrosulfatiden ist, gar nicht in Betracht, da selbst, wenn man das Protagon als eine Mischung solcher Substanzen auffaßt, angenommen werden muß, daß es eine Mischung in ganz konstanten Mengenverhältnissen ist. Man würde also nur dieses Mengenverhältnis festzustellen haben, um aus der Protagonbestimmung sofort die im Protagon enthaltenen Mengen Phosphatid, Cerebrosid und Cerebrosulfatid zu berechnen. Da sich ein solches Gemisch ganz anders verhält, wie das Protagon und sich durch kalten Alkohol und Äther teilweise in seine Bestandteile trennen läßt, so erscheint diese mit so großer Heftigkeit vertretene Anschauung hinfällig.]

Die von *Noll*[1]) ausgearbeitete Methode zur quantitativen Protagonbestimmung beruht auf der Bestimmung der durch Salzsäure abgespaltenen Zuckermenge. Diese Methode ist von *Koch* zur Bestimmung der Cerebroside verwendet worden (siehe dort). Die Ausführung der Protagonbestimmung geschieht daher in der dort angegebenen Weise, nur ist die Tabelle zur Berechnung des Cerebrons durch eine andere Tabelle zu ersetzen. In der beistehenden Tabelle sind die einer bestimmten Menge Kupfer, welche sich aus dem gefundenen Kupferoxyd berechnen läßt, entsprechenden Mengen Protagone angegeben.

Tabelle zur Berechnung des Protagons aus dem durch Reduktion erhaltenen Kupfer.

mgr Kupfer	*mgr* Prot.	*mgr* Kupfer	*mgr* Prot.	*mgr* Kupfer	*mgr* Prot.
5	27·5	20	84·4	35	141·9
6	31·3	21	88·3	36	146·0
7	35·1	22	92·0	37	149·8
8	39·0	23	95·8	38	153·5
9	42·6	24	99·7	39	157·4
10	46·4	25	103·5	40	161·3
11	50·3	26	107·3	41	165·2
12	54·2	27	111·1	42	169·1
13	58·0	28	115·0	43	172·8
14	61·6	29	118·7	44	176·6
15	65·5	30	122·6	45	180·5
16	69·4	31	126·6	46	184·4
17	73·1	32	130·4	47	188·3
18	76·9	33	134·3	48	192·2
19	81·7	34	138·1	49	196·1
				50	200·0

Diese Methode wäre jedoch nur dann gültig, wenn das Protagon sämtliche im nervösen Gewebe enthaltenen Cerebroside enthielte. Das steht jedoch vorläufig nicht fest. Wir wissen vielmehr, daß bei der Extraktion des Protagons zugleich Cerebron in den warmen oder kochenden Alkohol übergeht. Dieses Cerebron ist daher entweder im Gehirn als solches vorhanden neben dem Protagon oder es hat sich infolge der Einwirkung des Alkohols aus dem Protagon gebildet. Im ersteren Fall ließe sich das Protagon nicht ohne weiteres aus der Menge des abgespaltenen Zuckers bestimmen. Bis diese Frage gelöst ist, ist daher die *Noll*sche Berechnung nicht anwendbar.

Dagegen dürfte der Schwefelgehalt des Protagons eine einfache Bestimmung des Protagons zulassen. Das Protagon ist die einzige schwefelhaltige Lipoidsubstanz, die bisher aus dem Gehirn isoliert worden ist. Eine Bestimmung des Schwefels in dem „Lipoidniederschlag" (siehe Bestimmung der Phosphatide) gestattet daher eine Berechnung des Protagons. Der gefundene Schwefel multipliziert mit 138.88 gibt die Menge Protagon. Diese Berechnung ist merkwürdigerweise niemals ausgeführt worden. *Koch* be-

[1]) *Noll*, Über die quantitativen Beziehungen des Protagons zum Nervenmark. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27. S. 370 (1899).

rechnet den von ihm gefundenen Schwefel für ein hypothetisches Cerebrosulfatid, das bisher niemand isolieren konnte.

Berechnet man die von *Koch* gefundene Menge Lipoidschwefel in der eben angegebenen Weise, so erhält man für das Rückenmark 9% Protagon, während man nach der *Noll*schen Berechnung 8·5% Protagon erhält. Diese bemerkenswerte Übereinstimmung zeigt, daß im Rückenmark die Cerebrosulfatidgruppen und Cerebrosidgruppen in den gleichen Mengenverhältnissen vorhanden sind, wie im Protagon. Dasselbe gilt auch für das Corpus callosum, in welchem das Verhältnis Cerebrin : Schwefel = 86 : 1, während im Protagon Cerebrin : Schwefel = 83 : 1. Die graue Substanz ist arm an Lipoidschwefel und an Cerebrosidgruppen.

Diese Betrachtungen machen es sehr wahrscheinlich, daß sämtliche Cerebroside des nervösen Gewebes im Protagon gebunden sind, so daß also dann die *Noll*sche Methode zulässig wäre. Es wäre jedoch interessant, diese Methode zu gleicher Zeit durch eine Lipoid-Schwefelbestimmung zu kontrollieren.

Es ließe sich so feststellen, ob die schwefelhaltigen Lipoidgruppen und die Cerebrosidgruppen in allen Teilen des Nervengewebes in demselben Verhältnis zusammen vorhanden sind.

Darstellung und Nachweis tierischer Gifte.

Von **Edwin Stanton Faust**, Würzburg.

Unsere Kenntnisse der chemischen Eigenschaften und der pharmakologischen Wirkungen tierischer Gifte sind noch sehr lückenhaft. Daran trägt wohl die Hauptschuld die Schwierigkeit und Kostspieligkeit der Beschaffung des für solche Untersuchungen in großen Mengen erforderlichen Materials. Während die Gifte pflanzlichen Ursprungs in der Regel leicht zu beschaffendem frischen oder trockenem Material entstammen und letzteres, ohne Gefahr Veränderungen zu erleiden, im allgemeinen lange Transporte aus den entferntesten Ländern verträgt, kommt es bei Untersuchungen über tierische Gifte darauf an, die giftigen Produkte dem noch lebenden oder wenigstens vor sehr kurzer Zeit getöteten Tiere zu entnehmen und sie in möglichst frischem Zustande zu untersuchen. Die Nichtbeachtung dieser Vorsichtsmaßregel kann leicht zu groben Irrtümern führen, weil nach dem Tode bald Zersetzung der Gewebsbestandteile eintritt, sei es unter dem Einfluß von autolytischen Fermenten oder von Bakterien und anderen Mikroorganismen, welche die tierischen Gifte zerstören oder selbst Gifte bilden. Die Wirkungen der letzteren können dann die des gesuchten, im lebenden Tiere vorhandenen Giftes wesentlich beeinflussen, in manchen Fällen vielleicht sogar ganz verdecken.

Es besteht demnach die Forderung, das lebende Material an Ort und Stelle der auszuführenden Untersuchung zu verarbeiten, soweit es sich um das Verarbeiten von ganzen Tieren handelt, oder mindestens dem lebenden Tiere die Giftsubstanz zu entnehmen, falls sie sich in einem bestimmten Sekret oder Organ findet.

Zur Erreichung dieses Zieles müssen gegebene, giftige, tierische Produkte, welche in den meisten Fällen in Form eines Sekretes, d. h. eines Gemisches verschiedenartiger, wirksamer und unwirksamer Stoffe, vorliegen, chemisch zerlegt, giftige von ungiftigen Bestandteilen getrennt und die giftigen Bestandteile rein dargestellt und chemisch und pharmakologisch genau charakterisiert werden.

Was haben wir unter dem Begriffe „tierisches Gift“ zu verstehen? Es ergibt sich da zunächst dieselbe Schwierigkeit, welcher

wir bei der Definition des Wortes „Gift" im allgemeinen begegnen. Denn jedes der im tierischen Organismus vorkommenden Stoffwechselprodukte kann, wenn es in genügend großen Mengen dem Körper in geeigneter Weise einverleibt wird, deletäre Wirkungen bedingen und hervorrufen, ebenso wie dies bei der Einverleibung großer Mengen der für gewöhnlich ganz ungiftigen Substanzen (z. B. Chlornatrium) der Fall ist.

Halten wir daran fest, daß das Charakteristikum eines Giftes darin zu suchen ist, daß es auf chemische oder physikalisch-chemische Art seine schädliche Wirkung hervorbringt, und berücksichtigen wir, daß die Giftigkeit einer Substanz lediglich von quantitativen Verhältnissen abhängig ist, d. h., daß es auf die einverleibten Mengen der betreffenden Substanz ankommt, so können wir bei den Giften tierischen Ursprungs ebensowenig wie in der Toxikologie im allgemeinen eine für alle Fälle gültige und feststehende Definition geben.

Nicht weniger schwierig ist es zu entscheiden, ob ein bestimmtes Tier als „giftig" oder „ungiftig" zu bezeichnen ist. Als bewegliches und selbständig handelndes Individuum kann ein mit einem Giftapparate ausgestattetes Tier sich willkürlich dieses Apparates zum Schaden seines Gegners oder Angreifers bedienen. In diesem Falle ist das Tier ohne Zweifel als „giftig" zu bezeichnen. Allein wir kennen andrerseits eine nicht geringe Anzahl von Tieren, welche giftige Stoffwechselprodukte enthalten, jedoch nicht imstande sind, diese Giftkörper einem anderen Tiere willkürlich beizubringen. Derartige Verhältnisse finden wir z. B. bei unserer gewöhnlichen Kröte, welche in ihrem Hautdrüsensekret giftige Substanzen produziert, aber aktiv von letzteren keinen Gebrauch machen kann. Gewisse Schlangen, welche keine Giftzähne besitzen, produzieren ebenfalls in bestimmten Drüsen ein giftiges Sekret, dessen wirksame Bestandteile auch in ihrem Blute enthalten sind.

Es empfiehlt sich daher, zu unterscheiden zwischen **„aktiv"** und **„passiv"** giftigen Tieren. Als Typus der ersteren Gifttiere sind die „Giftschlangen" (im populären Sinne) anzusprechen, welche ihren Giftapparat willkürlich in Funktion treten lassen können. Passiv giftig wären in diesem Sinne z. B. die Canthariden und alle Giftpflanzen.

In einer Zusammenstellung der Gifte tierischen Ursprungs müssen demnach nicht nur diejenigen Giftstoffe, welche von Tieren, die mit einem Apparate zum Einverleiben des Giftes versehen sind, berücksichtigt werden, sondern auch solche giftige Stoffe tierischer Herkunft, die von Tieren stammen, welche eines derartigen Apparates ermangeln.

Zu den tierischen Giften gehören demnach alle pharmakologisch wirksamen Stoffe, die von Tieren direkt, d. h. physiologischerweise, produziert werden, nicht aber solche, welche durch Bakterien und andere Mikroorganismen im Tierkörper entstehen oder, von letzteren produziert, in fertigem Zustande von außen aufgenommen werden.

Milzbrand, Rotz und die Wutkrankheit sind z. B. keine Vergiftungen, sondern Infektionskrankheiten, welche unter dem Namen „Zoonosen" zusammengefaßt werden und für sich besprochen werden müssen.

Die giftigen Zersetzungsprodukte toten. tierischen Materials gehören ebensowenig wie die unter dem Einflusse von Mikroorganismen im lebenden Organismus gebildeten giftigen Stoffe zu den tierischen Giften. Auch hier handelt es sich nicht um physiologischerweise im Organismus gebildete giftige Stoffwechselprodukte.

Die hauptsächlichste und häufigste Quelle der Vergiftungen durch tierische Gifte ist die zufällige Verwundung durch Bisse oder Stiche giftiger Tiere, welchen außer den Eingeborenen besonders Reisende in den Tropengegenden, Naturforscher, Arbeiter, meistens Neger auf den Zuckerplantagen, Jäger, sogenannte Schlangenbeschwörer, Jongleure usw. ausgesetzt sind. Die praktische Bedeutung dieser Kategorie von Vergiftungen durch tierische Gifte geht schon aus der Tatsache hervor, daß in Indien allein jährlich etwa 20.000 Menschen an den Folgen von Schlangenbissen zugrunde gehen.

Systematik.

Bei dem gegenwärtigen Stande unserer Kenntnisse der tierischen Gifte ist eine Einteilung des Stoffes nach pharmakologischen Gesichtspunkten nicht durchzuführen. Es fehlen bislang die erforderlichen Kenntnisse der Wirkungen und Eigenschaften der wirksamen Substanzen. In der großen Mehrzahl der Fälle bedienen und begnügen sich die Autoren bei ihren Versuchen noch gegenwärtig mit der Anwendung von mehr oder weniger unreinen Gemischen und Extrakten. Infolge dieser Verhältnisse läßt sich auch nur in vereinzelten Fällen ein klares Bild der chemischen Eigenschaften und der Giftwirkung eines gegebenen Stoffes gewinnen, weshalb eine Klassifizierung nach pharmakologischen Prinzipien untunlich erscheint.

Ebensowenig durchführbar ist aus denselben Gründen eine Einteilung nach chemischen Eigenschaften, abgesehen davon, daß eine Klassifikation auf chemischer Basis sehr verschiedenartig wirkende Stoffe in einer Gruppe vereinigen könnte.

Es ergibt sich daraus die Notwendigkeit, einer Klassifikation der tierischen Gifte vorläufig die Stellung des das Gift liefernden Tieres im zoologischen System zugrunde zu legen. Sie ist nach Lage der Dinge zurzeit die einzig durchführbare.

Säugetiere.

Ornithorhynchus paradoxus, Platypus.

Das Schnabeltier, zur Ordnung der Monotremata gehörig, deren eine Gattung Ornithorhynchus von diesem allein gebildet wird, nimmt im zoologischen System eine Sonderstellung ein und beansprucht als einziges, aktiv giftiges Säugetier ein besonderes Interesse.

Das männliche Schnabeltier besitzt an beiden Hinterfüßen je einen an der Spitze durchlöcherten und von einem feinen Kanal von etwa 2 *mm* Durchmesser durchzogenen, beweglichen Sporn, welcher vermittelst eines längeren (5 *cm*) Ausführungsganges mit einer, in der Hüftgegend gelegenen,

etwa 3 *cm* langen und 2 *cm* breiten lobulären Drüse kommuniziert.[1]) Die beiden Drüsen liefern ein eiweißreiches Sekret, welches durch den Ausführungsgang zum Sporn gelangt und durch den letzteren nach außen befördert werden kann. Seine Zusammensetzung und Wirkungen sind von *C. J. Martin* und *Frank Tidswell*[2]) und später von *F. Noc*[3]) untersucht worden.

Schon im Jahre 1822 berichtet Dr. *Patrick Hill*[4]) über Mitteilungen eines Eingeborenen, nach dessen Angaben eine Verwundung durch das männliche Schnabeltier sehr schmerzhaft und von Anschwellen des getroffenen Gliedes gefolgt sein soll; von einem letalen Ausgang bei einer derartigen Verwundung eines Menschen hat er nichts erfahren.

Für die Giftigkeit des Sekretes und die Verwendung des ganzen Apparates als Waffe sprechen neben den Erfahrungen von *Hill* die Angaben von *Blainville*[5]), *Meckel, R. Knox*[6]) und *Spicer*[7]). *Anderson Stuart*[8]) berichtet schließlich noch über die Wirkungen dieses Sekretes an Jagdhunden. Vier verwundete Tiere gingen unter den auch am Menschen beobachteten Symptomen in soporösem Zustande zugrunde; ein Hund erholte sich.

C. J. Martin und *Tidswell* haben dann das Sekret der Glandula femoralis des Ornithorhynchus chemisch und pharmakologisch untersucht. Nach diesen Autoren charakterisiert sich das Sekret chemisch als eine Lösung von Eiweißstoffen; in größter Menge findet sich ein zur Klasse der Albumine gehöriger Eiweißkörper, daneben eine geringe Menge einer Albumose. Nukleoalbumine fehlen. Welchem der Bestandteile das Sekret seine pharmakologischen Wirkungen verdankt, ist unentschieden.

Für ihre Tierversuche verwendeten *Martin* und *Tidswell* Lösungen des durch Alkohol aus dem Sekret von drei Paar Drüsen gefällten Substanzgemenges, dessen Gewicht nach dem Trocknen bei 40° 0·4 *g* betrug. Die Substanz stellte ein in Wasser und verdünnten Salzlösungen zu einer opaleszierenden, neutral reagierenden Flüssigkeit lösliches, weißes Pulver dar.

Nach subkutaner Injektion von 0·05 *g* dieser Substanz entwickelte sich bei einem Kaninchen innerhalb 24 Stunden in der Umgebung der

[1]) Anatomisches bei *Meckel*, Deutsches Archiv f. Physiologie. Bd. 8 (1823) und Descriptio anatomica Ornithorhynchi paradoxi. Lips. 1826. — Vgl. auch *Martin* und *Tidswell* a. a. O.

[2]) Observations on the femoral gland of Ornithorhynchus and its secretion etc. Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales. July 1894.

[3]) Note sur la sécrétion venimeuse de l'Ornithorhynchus paradoxus. Soc. de Biol. T. 56. p. 451 (1904).

[4]) On the Ornithorhynchus paradoxus, its venomous spur and general structure. Trans. Linn. Soc. Vol. 13. p. 622 (1822).

[5]) Bull. Soc. Philomatique. p. 82. Paris 1817.

[6]) Observations on the Anatomy of the Duckbilled Animal of New South Wales. Mem. Wernerian Soc. Nat. Hist. (1824).

[7]) On the effects of wounds inflicted by the spurs of the Platypus. Papers and Proc. Roy. Soc. p. 162. Tasmania 1876.

[8]) Royal Society of New South Wales. Anniversary address by the President, T. P. Anderson Stuart (1894).

Injektionsstelle eine umfangreiche Geschwulst. Bald nach der Injektion und an dem darauffolgenden Tage verhielt sich das Tier sehr ruhig und fraß wenig. Geringe Temperatursteigerung. Eine Blutprobe gerann normal und zeigte unter dem Mikroskop nichts Besonderes. Am fünften Tage nach der Injektion war die Geschwulst vollständig verschwunden und das Versuchstier scheinbar ganz normal.

Bei intravenöser Applikation von 0·06 *g* sank der Blutdruck unmittelbar von 97 auf 60 *mm*, nach 90 Sekunden auf 27 *mm* Quecksilber. Die Respiration war zunächst sehr beschleunigt und vertieft und sistierte plötzlich um dieselbe Zeit, als der Blutdruck auf 27 *mm* gesunken war. Bei der sofortigen Öffnung des Tieres schlug das Herz noch schwach. Im rechten Herzen und im ganzen venösen System war das Blut geronnen.

Die subkutane Applikation des Giftes bewirkt also dieselben Erscheinungen, wie sie nach Verwundungen von Menschen und Hunden durch die Sporen des Ornithorhynchus beobachtet wurden. Das Gift wird wahrscheinlich nur langsam resorbiert.

Bei der intravenösen Einverleibung sind die Wirkungen wohl als Folge der intravaskulären Gerinnung des Blutes aufzufassen. Darauf deuten u. a. die dyspnoischen Krämpfe und das anfangs sehr rasche, dann, insbesondere nach kleineren Gaben, aber langsame Sinken des Blutdrucks.

In diesen Punkten bietet das Ornithorhynchusgift eine weitgehende Ähnlichkeit mit dem Gifte von Hoplocephalus und anderer australischer Giftschlangen, welches aber das Gift des Schnabeltieres um das 5000fache an Wirksamkeit übertrifft.

F. Noc fand, daß das Gift auch in vitro einige Eigenschaften der Schlangengiftsekrete zeigt. Wie das Gift von Bothrops lanceolatus, ruft es Gerinnung des mit Oxalsäure versetzten Plasmas hervor. Erhitzen auf 80° hebt die koagulierende Wirkung auf. Im Gegensatz zum Vipern- und Bothropsgift entbehrt aber das Ornithorhynchusgift der hämolytischen und proteolytischen Eigenschaften.

* * *

Im Organismus der Säugetiere finden sich zwei sehr genau charakterisierte, giftige Stoffwechselprodukte, deren eines bereits große praktische Bedeutung erlangt hat.

Das Suprarenin.[1]

Das Suprarenin *(v. Fürth)*, auch Adrenalin (Takamine) und Epinephrin *(Abel)* genannt, findet sich in den Nebennieren.

[1]) Literatur bis 1899 in der ausführlichen Monographie von *Hultgren* und *Anderson*, Studien über die Physiologie und Anatomie der Nebennieren. Skandinavisches Archiv f. Physiologie. Bd. 9. S. 72—313 (1899). — Literatur chemischen Inhalts bis Ende 1903 in dem Sammelreferat von *O. v. Fürth*. Biochemisches Zentralblatt. Bd. 2. Nr. 1 (1904). — Literaturzusammenstellung bis August 1907. *Albert C. Crawford*, The use of suprarenal glands in the physiological testing of drug plants. U. S. Department of

Es wurde zum ersten Male von *J. Takamine*[1]) (1901) in kristallinischer Form dargestellt; fast gleichzeitig mit *Takamine* und unabhängig von ihm gewann auch *Aldrich*[2]) diesen Körper in wohl ausgebildeten Kristallen.

Die Methode der beiden letztgenannten Forscher beruht im wesentlichen darauf, daß aus sehr stark eingeengten und von unwirksamen Produkten durch Alkohol oder Bleiacetat größtenteils befreiten Nebennierenextrakten sich die blutdrucksteigernde Substanz auf Zusatz von konzentriertem Ammoniak in Form von mikrokristallinischen Körnern abscheidet. Die so erhaltenen Präparate können durch wiederholtes Lösen in Säure und Fällen mit Ammoniak gereinigt werden und erscheinen dann als Kristalldrusen, die aus wohl ausgebildeten, prismatischen Nadeln oder rhombischen Blättchen zusammengesetzt sind. Diese Substanz ist jetzt unter dem Namen Adrenalin im Handel zu haben.

Aus Nebennierenbrei stellte *Abel*[3]) das Epinephrin dar durch Extraktion mit alkoholischer Trichloressigsäurelösung und Zusatz von Ammoniak zu den filtrierten und unter vermindertem Druck eingeengten Auszügen, während *v. Fürth*[4]) bei der Darstellung des Suprarenins zerkleinerte Rindsnebennieren mit angesäuertem Wasser unter Zusatz von Zinkstaub extrahierte, um Veränderungen (Oxydation) des leicht zersetzlichen wirksamen Stoffes vorzubeugen.[5])

Das Adrenalin löst sich schwer in kaltem, etwas reichlicher in heißem Wasser. Es löst sich leicht in verdünnten Säuren unter Bildung von Salzen und reagiert schwach alkalisch auf Lackmuspapier. In Alkohol ist es schwer löslich; unlöslich in Chloroform, Amylalkohol, Schwefelkohlenstoff, Äther, Aceton und Petroleumäther. In kaustischen Alkalien ist das Adrenalin entsprechend seiner Phenolnatur löslich, nicht aber in Alkalikarbonaten und Ammoniak. Es wird durch Kaliumquecksilberjodid, Pikrinsäure, Gerbsäure, Phosphormolybdän- und Phosphorwolframsäure und Quecksilberchlorid nicht gefällt und reduziert *Fehling*sche und ammoniakalische Silberlösung. Die wässerige Lösung färbt sich an der Luft rot und wird später braun; auf Zusatz von Eisenchlorid entsteht die für diese Substanz charakteristische Grünfärbung. Jod, Salpetersäure, Kaliumbichromat, Ferricyankalium und Goldchlorid geben Rotfärbung.

Die Zusammensetzung des Adrenalins entspricht der empirischen Formel $C_9 H_{13} N_3 O$, welche durch zahlreiche Elementaranalysen und Mole-

---

Agriculture. Bureau of Plant Industry. Bulletin. No. 112. Washington 1907. — Vgl. auch *S. Moeller*, Kritisch-experimentelle Beiträge zur Wirkung des Nebennierenextraktes (Adrenalin). Inaug.-Diss. Würzburg 1906.

[1]) American Journal of Pharmacy. Vol. 73. November 1901. — Therapeutic Gazette. Vol. 25. p. 221 (1901).

[2]) American Journal of Physiology. Vol. 5. p. 457 (1901).

[3]) *John J. Abel*, Weitere Mitteilungen über das Epinephrin. Ber. d. Deutschen chem. Ges. Jg. 36. S. 1839 (1903).

[4]) *O. v. Fürth*, Zur Kenntnis des Suprarenins (Adrenalins). Monatshefte f. Chemie. Bd. 24. S. 265 (1903).

[5]) Vgl. auch D. R. P. Nr. 160.397; Nr. 167.317.

kulargewichtsbestimmungen (*Aldrich, Takamine, v. Fürth, Pauly*[1]), *Jowett*[2]), *Bertrand*[3]), *Stolz*[4]), *Abderhalden* und *Bergell*[5]) begründet ist. Die Konstitution[6]) dieser Verbindung findet ihren Ausdruck in der Formel:

$$(HO)_2C_6H_3 . CH . OH . CH_2 . NH . CH_3,$$

welche die Bildung der Spaltungs- und Oxydationsprodukte und ihre Reaktionen in befriedigender Weise erklärt.

Die von *F. Stolz* und von *E. Friedmann* zur Aufklärung der Konstitution des Adrenalins unternommenen Versuche bestätigen die folgenden, durch *v. Fürth* festgestellten Tatsachen:

1. Das Adrenalin enthält einen Benzolkern, welcher in 2-, 5-, 6-Stellung substituiert ist.

2. In seinem Molekül sind drei Hydroxylgruppen (OH) vorhanden, wovon zwei sich in 5-, 6-Stellung am Benzolkern finden.

3. In dem Adrenalinmolekül ist eine Methylimidgruppe enthalten.

Durch Einwirkung von Methylamin auf Chloracetobrenzkatechin

$$C_6H_3(OH)_2CO . CH_2 . \vdots Cl + H \vdots NH . CH_3$$

erhielt *Stolz* das Methylaminoketobrenzkatechin:

$$C_6H_3(OH)_2 . CO . CH_2 . NH . CH_3 + HCl,$$

welches nach Untersuchungen von *H. Meyer*[7]) qualitativ wie das Adrenalin wirkt. Durch Reduktion des Methylaminoketobrenzkatechins bilden sich Produkte, deren Wirkungen sich denjenigen des Adrenalins quantitativ nähern.[8])

Die **Wirkungen des Adrenalins** betreffen in erster Linie das Gefäßsystem und das Herz und äußern sich in einer hochgradigen Steigerung des Blutdruckes. Diese beruht auf der Verengerung der peripheren Gefäße und wahrscheinlich auf einer erregenden Wirkung des Adrenalins auf die motorischen Apparate des Herzens sowie auf die Herzmuskulatur selbst.

Wenn man das Adrenalin auf gefäßreiche Stellen, namentlich auf Schleimhäute appliziert, so beobachtet man, daß diese Stellen blutleer werden; daß also das Adrenalin ganz lokal eine Verengerung der kleinsten

---

[1]) Ber. d. deutschen chem. Ges. Jg. **36**. S. 2944 (1903); Jg. **37**. S. 1388 (1904).

[2]) Transactions of the Chemical Society. Vol. **20**. p. 18. London 1904.

[3]) Compt. rend. T. **139**. p. 502 (1904).

[4]) Ber. d. Deutschen chem. Ges. Jg. **37**. S. 4149 (1904).

[5]) *Abderhalden* und *Bergell*, Ber. d. Deutschen chem. Ges. Jg. **37**. S. 2022 (1904).

[6]) *E. Friedmann*, Die Konstitution des Adrenalins. Inaug.-Diss. Straßburg 1906.

[7]) Physiologisches Zentralblatt. Bd. **18** (16). S. 501 (1904). Vgl. auch *O. Loewi* und *H. Meyer*, Über die Wirkungen synthetischer, dem Adrenalin verwandter Stoffe. Archiv f. exp. Pathol. u. f. Pharmak. Bd. **53**. S. 213 (1905).

[8]) Vgl. auch *H. D. Dakin*, Synthese von dem Adrenalin verwandter Substanzen. Proc. Chem. Soc. Vol. **21**. p. 154 (1905) und Proc. Roy. Soc. London. Vol. **76**. Serie B. p. 491 bis p. 503 (1905); ref. in Chem. Zentralblatt. 1905. II. S. 57 und 1458.

Gefäße, feinen Arterien, arteriellen Kapillaren und Kapillaren im allgemeinen hervorruft. Daraus geht hervor, daß es eine besondere, eigenartige Wirkung auf die Wandungen dieser Gefäßgebiete ausübt.

In den Lungengefäßen und in dem rechten Herzen, d. h. in dem kleinen Kreislauf, wird der Blutdruck durch Adrenalin nur wenig, wenn überhaupt, gesteigert [*Gerhardt*[1]), *Velich*[2])]. Die Gefäße der Niere scheinen besonders empfindlich für die Adrenalinwirkung.[3])

Die Zerstörung des Adrenalins im Organismus ist nach *G. Embden* und *O. v. Fürth*[4]) auf die Alkaleszenz des Blutes und der Gewebe, nicht aber auf eine durch Fermente bewirkte oxydative Zerstörung desselben (*Langlois, Athanasiu*) zurückzuführen.[5])

Eine 0·1%ige Sodalösung hebt bei einer Temperatur von 40° die Wirksamkeit des Adrenalins schneller auf als Pferdeserum oder Rinderblut unter gleichen Bedingungen.

Daß das schnelle Abklingen der Adrenalinwirkung nicht durch die rasche Ausscheidung der wirksamen Substanz durch die Nieren bewirkt wird, geht aus Versuchen von *Czybulski*[6]) hervor; in dem kurze Zeit nach der intravenösen Einverleibung größerer Mengen von Adrenalin aus der Blase entnommenen Harne findet sich keine blutdrucksteigernde Substanz.[7])

Die tödliche Dosis beträgt bei intravenöser Applikation 0·1 bis 0·2 *mg* pro Kilogramm Körpergewicht für Kaninchen und Hunde[8]), bei subkutaner Einverleibung etwa 6 *mg* pro Kilogramm Hund.[9])

Die praktische Bedeutung und die therapeutische Verwendung des Adrenalins beruhen auf der gefäßverengernden Wirkung desselben. Diese tritt auch bei lokaler Applikation des Mittels ein und ist daher nützlich bei chirurgischen Eingriffen, wo es darauf ankommt, ein möglichst blutleeres Operationsgebiet herzustellen, Blutverluste zu vermeiden oder Blutungen zu stillen, respektive bestehende Hyperämie zu beseitigen.

Die subkutane oder intravenöse Injektion des Adrenalins zu therapeutischen Zwecken am Menschen ist nicht ohne Gefahr. Auch dann nicht, wenn akute Erscheinungen vollständig ausbleiben. Aus den Versuchen *Ger-*

---

[1]) Archiv f. exp. Pathol. u. f. Pharmak. Bd. **44**. S. 173 (1900).

[2]) Wiener med. Wochenschr. (1898). Nr. 26.

[3]) *D. Jonescu*, Notiz über eine besondere Affinität der Nierengefäße zu Adrenalin. Wiener klin. Wochenschr. Bd. **21**. Nr. 14 (1908).

[4]) *Hofmeisters* Beiträge zur chem. Physiologie u. Pathologie. Bd. **4**. S. 421 (1903).

[5]) *W. Kretschmer*, Dauernde Blutdrucksteigerung durch Adrenalin und über den Wirkungsmechanismus des Adrenalins. Über die Beeinflussung der Adrenalinwirkung durch Säure. Archiv f. exp. Patholog. u. Pharmak. Bd. **57**. S. 423—440 (1907).

[6]) Gazeta Lekarska. Nr. 12 (1895). (Polnisch.) Vgl. Physiolog. Zentralblatt. Bd. **9**. S. 172 (1895).

[7]) *G. Embden* und *O. v. Fürth*, a. a. O. S. 427.

[8]) *J. Lesage*, Recherches expérimentales sur l'adrénaline. Arch. internat. de Pharmacod. T. **13**. p. 245 (1904).

[9]) *S. Amberg*, Über die Toxicität des wirksamen Prinzips der Nebennieren. Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie. T. **11**. p. 57—100 (1902).

hardts an Hunden geht hervor, daß bei der Adrenalinwirkung die Herzaktion ganz plötzlich versagen kann, während der Blutdruck hoch über der Norm steht.

Nachweis und quantitative Bestimmung des Adrenalins.

Die Farbenreaktionen, welche das Adrenalin mit Eisenchlorid (grün) und mit Jod (rosarot) gibt, eignen sich nur dann zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung dieses Körpers, wenn die Substanz in reinem Zustande vorliegt bei annähernd neutraler Reaktion. Anwesenheit von viel freier Säure und andere Umstände können den Ausfall der Reaktion mit Eisenchlorid stören.[1]) Die bekannte Rotfärbung längere Zeit aufbewahrter Lösungen des Adrenalins stört bei der Jodreaktion ebenfalls; doch haben *Abelous, Soulié* und *Toujan*[2]) diese Reaktion zur quantitativen Bestimmung des Adrenalins benutzt, indem sie die Farbe der zu bestimmenden Lösung mit derjenigen einer frisch hergestellten Lösung von bekanntem Gehalt an reinem Adrenalin nach Jodzusatz verglichen.

Die Wertbestimmung von Adrenalinlösungen und der Nachweis des Adrenalins geschieht aber am sichersten durch den **Tierversuch.**

1. Durch Messung der Blutdrucksteigerung nach intravenöser Injektion von Adrenalin oder eines Auszuges aus Nebennieren.

2. Reaktionen am Auge:

a) Verdünnte Lösungen von Adrenalin in den Konjunktivalsack geträufelt bewirken Blutleere und daher Blässe der Konjunktiva, später Pupillenerweiterung.[3]) Die Wirkung auf die Konjunktiva tritt noch bei einer Verdünnung von 1 : 120.000 ein.

b) Am enucleierten Bulbus (Froschauge) sah *Ehrmann*[4]) selbst bei intensiver Beleuchtung nach 0·000025 *mg* Adrenalin regelmäßig Pu-

[1]) *F. Batelli,* Dosage colorimétrique de la substance active des capsules surrénales. Compt. rend. Heb. Soc. de Biologie. T. 54. p. 571 (1902). — *R. Boulud* et *B. Fayol,* Sur le dosage colorimétrique de l'adrénaline. Ebenda. T. 55. p. 358 (1903). — *I. D. Cameron,* On the methods of standardising suprarenal preparations. Proc. Roy. Soc. Edinburgh. Vol. 26. p. 157 (1906). — *O. v. Fürth,* Zur Kenntnis der brenzkatechinähnlichen Substanz der Nebennieren. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. 29. S. 115 (1900). — Zur Kenntnis des Suprarenins. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 1. S. 244 (1902).

[2]) *J. E. Abelous, A. Soulié* et *G. Toujan,* Dosage colorimétrique par l'iode de l'adrénaline. Compt. rend. Hebd. Soc. de Biologie. T. 59. p. 301 (1905). — Sur un procédé de controle des dosages chimique et physiologique de l'adrénaline. Compt. rend. Hebd. Soc. de Biologie. T. 60. p. 174 (1906). — *C. E. Vandekleed,* Method for the preparation of the active principle of the suprarenal gland. Pharmaceutical Era. Vol. 36. p. 478 (1906).

[3]) *S. J. Meltzer* and *K. M. Auer,* Über den Einfluß des Nebennierenextraktes auf die Pupille des Frosches. Zentralblatt f. Physiologie. Bd. 18. S. 317 (1904). — *R. H. Kahn,* Über die Beeinflussung des Augendruckes durch Extrakte chromaffinen Gewebes (Adrenalin). Ebenda. Bd. 20. S. 33 (1906). — *M. Lewandowsky,* Über die Wirkungen des Nebennierenextraktes auf die glatten Muskeln, im besonderen des Auges. Archiv f. Anat. u. Physiologie. Physiolog. Abt. S. 360 (1899).

[4]) *R. Ehrmann,* Über eine physiologische Wertbestimmung des Adrenalins. Archiv f. exp. Patholog. und f. Pharmakologie. Bd. 53. S. 97 (1905). — Zur Physiologie und exp. Pathologie der Adrenalinsekretion. Ebenda. Bd. 55. S. 39 (1906).

pillenerweiterung: 0·00001 *mg* bewirkten unter diesen Bedingungen noch deutliche Erweiterung der Pupille, während 0·000005 *mg* keine wahrnehmbare Wirkung zeigten.

c) Bei normalen Menschen, Hunden und Katzen ist Adrenalininstillation in den Konjunktivalsack ohne Einfluß auf die Pupillenweite. Unter besonderen Verhältnissen tritt aber nach *O. Loewi*[1]) Mydriasis ein, so z. B. nach Totalexstirpation des Pankreas (bei Hunden und Katzen), bei manchen diabetischen Menschen und bei manchen Fällen von Basedow.

3. Direkte Messung der gefäßverengernden Wirkung:

a) Durchblutung von Fröschen mit Adrenalinlösungen nach *Läwen.*[2])

b) Wirkung auf in *Ringer*scher Lösung aufbewahrte Querschnitte (Ringe) der überlebenden Arteria subclavia von Rindern nach *O. B. Meyer*[3]), welcher bei Verdünnungen der Adrenalinlösungen von 1 : 100.000.000 an diesem Versuchsobjekt die gefäßverengernde Wirkung noch eintreten sah.

4. Wirkungen des Adrenalins auf die Sekretionen.

Das Adrenalin verursacht eine Steigerung der Sekretion der Speicheldrüsen[4]) und der Hautdrüsen des Frosches[5]), nicht aber der Schweißdrüsen. Atropin unterdrückt diese Sekretionen nicht, so daß es sich, wie beim Physostigmin, um eine Wirkung auf das Drüsenparenchym handelt.

Die gefäßverengernde Wirkung des Adrenalins erinnert am meisten an die des Hydrastins und Hydrastinins, doch fehlen dem Adrenalin, wie es scheint, die Wirkungen der letzteren Stoffe auf das Zentralnervensystem, und umgekehrt jenen die lokale, gefäßverengernde Wirkung.

Die Gallensäuren.

Die der Galle der höheren Tierklassen eigentümlichen stickstoff- und zum Teil schwefelhaltigen organischen Säuren, welche darin in Form ihrer leicht kristallinisch zu erhaltenden Natriumsalze vorkommen und vom physiologischen Standpunkte als die wichtigsten Gallenbestandteile zu betrachten sind, müssen als tierische Gifte im weiteren Sinne hier besprochen werden und verdienen auch wegen ihrer eigentümlichen Wirkungen unter pathologischen Verhältnissen beim Ikterus des Menschen ein besonderes Interesse.

---

[1]) *O. Loewi*, Über eine neue Funktion des Pankreas und ihre Beziehung zum Diabetes mellitus. Archiv f. exp. Patholog. u. Pharmak. Bd. 59. S. 83 (1908).

[3]) *A. Läwen*, Quantitative Untersuchungen über die Gefäßwirkung von Suprarenin. Archiv f. exp. Patholog. u. Pharmak. Bd. 51. S. 422 (1904).

[3]) *O. B. Meyer*, Über einige Eigenschaften der Gefäßmuskulatur. Zeitschr. für Biologie. Bd. 48. S. 365 (1906).

[4]) *J. N. Langley*, Observations on the physiological action of extracts of the suprarenal bodies. Journal of Physiology. Vol. 27. p. 237 (1901).

[5]) *R. Ehrmann*, Über die Wirkung des Adrenalins auf die Hautdrüsensekretion des Frosches. Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmak. Bd. 53. S. 137 (1905).

Neuere Untersuchungen[1]) machen es sehr wahrscheinlich, daß die Cholsäure dem Cholesterin[2]) chemisch nahe verwandt ist.

Pharmakologische Wirkungen der Gallensäuren, welche zum Nachweis derselben dienen können.

Die Wirkungen der Gallensäuren betreffen das Nervensystem, die Muskeln, den Zirkulationsapparat und das Blut. Die Galle sowohl als die reinen Gallensäuren und deren Natriumsalze wirken hämolysierend. Diese Wirkung ist zuerst von *Hünefeld*[3]) beobachtet und von *Rywosch*[4]) genauer untersucht worden. Letzterer führte vergleichende Untersuchungen über den Grad der hämolytischen Wirkungen der verschiedenen gallensauren Salze aus und fand dabei folgendes Verhältnis in der Intensität der hämolytischen Wirkung der verschiedenen Gallensäuren.

Glykocholsaures Natrium	=	1
Hyocholsaures Natrium	=	4
Cholsaures Natrium	=	4
Choloidinsaures Natrium	=	10
Taurocholsaures Natrium	=	12
Chenocholsaures Natrium	=	14

Demnach scheint für den Grad der hämolytischen Wirkung der Gallensäuren nicht allein der Cholsäurekomponent maßgebend zu sein: auch der Paarling und die Art der Bindung desselben an die Cholsäure scheinen dabei eine Rolle zu spielen.

Die hämolytische Wirkung der Gallensäuren scheint auch im lebenden Organismus, aber nur bei ihrer Injektion in das Blut zustande zu kommen und den Übergang von Hämoglobin in den Harn (Hämoglobinurie) zu verursachen, welch letzterer dann auch Harnzylinder und Eiweiß enthalten kann.

Die weißen Blutkörperchen sowie ferner Amöben und Infusorien werden ebenfalls durch die Gallensäuren geschädigt.

Die Gerinnung des Blutes wird durch die Gallensäuren (tauro- und chenocholsaures Natrium), wenigstens im Reagenzglasversuche, in der Konzentration von 1 : 500 beschleunigt, bei der Konzentration 1 : 250 dagegen vollständig aufgehoben *(Rywosch)*.

Die Wirkungen auf die Muskeln äußern sich zunächst in einer Verminderung der Reizbarkeit (Irritabilität), welche bis zur vollständigen Lähmung fortschreiten kann.

---

[1]) *H. Schrötter, R. Weizenbröck* und *R. Witt*, Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins und der Cholalsäure und über ein gemeinsames Abbauprodukt derselben. Sitzungsberichte d. Kaiserl. Akad. d. Wissenschaften in Wien. Bd. **117**. S. 1 (1908).

[2]) *A. Windaus*, Über Cholesterin: Berichte der Deutsch. chem. Ges. Jg. **41**. S. 2558 (1908).

[3]) *Hünefeld*, Der Chemismus in der tierischen Organisation. Leipzig 1840.

[4]) *D. Rywosch*, Vergleichende Versuche über die giftige Wirkung der Gallensäuren. Arbeiten des Pharmakologischen Instituts zu Dorpat. Herausgegeben von *R. Kobert*. Bd. 2. S. 102 (1888). Daselbst auch die ältere Literatur ausführlich zusammengestellt.

Das Zentralnervensystem erleidet unter dem Einfluß der gallensauren Salze eine Herabsetzung seiner Funktionsfähigkeit bis zur vollständigen Lähmung.

Die Wirkung der Gallensäuren auf den Zirkulationsapparat sind seit den Untersuchungen von *Röhrig*[1]) vielfach experimentell bestätigt worden. Sie äußern sich in einer Verkleinerung des Pulsvolumens und Verminderung der Pulsfrequenz, welch letztere besonders beim Ikterus häufig beobachtet wird und von *Frerichs* zuerst als eine Folge der Gallenwirkung bei dieser Krankheit vermutet wurde. Das Sinken des Blutdruckes nach der Injektion von gallensauren Salzen ist eine Folge der Herzwirkungen. Vielleicht ist dabei auch eine Gefäßwirkung im Spiele.

Die an Tieren beobachteten Allgemeinerscheinungen nach der subkutanen Injektion von gallensauren Salzen bestehen in Durchfall, Mattigkeit, Somnolenz, verminderter Puls- und Atemfrequenz; Einverleibung von größeren Mengen bewirkt allgemeine Lähmung.

Nach intravenöser Injektion sind mehr oder weniger heftige Krämpfe, Erbrechen, verlangsamtes Atmen und Tod unter asphyktischen Erscheinungen und tetanischen Krämpfen beobachtet worden.

Bei intravenöser Injektion betragen die tödlichen Mengen pro Kilogramm Körpergewicht:

	Kaninchen	Hunde
Taurocholsaures Natrium	0·35 *g*	0·6—0·7 *g*
Glykocholsaures Natrium	0·50 „	0·8—1·0 „

Die Gallensäuren lassen sich nach ihren Wirkungen im pharmakologischen System am besten der Gruppe der „Saponinsubstanzen" anreihen. Mit diesen haben sie qualitativ die Wirkungen auf die Blutkörperchen, die Muskeln, den Zirkulationsapparat und auf das Nervensystem gemein.

Schlangen, Ophidia.

Die Giftorgane der Schlangen.[2])

Die bei den Proteroglyphen gefurchten, bei den Solenoglyphen von einem Kanal durchbohrten Giftzähne dienen zur Einverleibung des Giftes.

Die Stellung und die Größe der Giftzähne ist bei den verschiedenen Giftschlangen eine sehr verschiedene. Diese beiden für den Grad der Giftwirkung wichtigen Faktoren scheinen in einer gewissen Beziehung zu der Wirksamkeit des Giftes zu stehen.[3])

Die **Giftdrüsen** liegen in der Regel auf beiden Seiten des Oberkiefers hinter und unter den Augen und sind von sehr verschiedener

---

[1]) *A. Röhrig*, Über den Einfluß der Galle auf die Herztätigkeit. Leipzig 1863.

[2]) Über „giftige" und „ungiftige" Schlangen vgl. *E. St. Faust*, Die tierischen Gifte. S. 32. Braunschweig 1906.

[3]) *Faust*, l. c. S. 40 und 50.

Größe und Form, im allgemeinen aber der Größe des Tieres entsprechend. Bei manchen Schlangen erstrecken sie sich jedoch auch auf den Rücken und bei Callophis liegen sie innerhalb der Bauchhöhle, wo sie sich auf ein Viertel bis die Hälfte der Länge des ganzen Tieres als langgestreckte drüsige Organe ausdehnen. Ihr Bau charakterisiert sie als acinöse Drüsen und ist den Speicheldrüsen der höheren Tiere analog. Das von diesen Drüsen abgesonderte **Gift** häuft sich in den Acini und dem an der Basis des Giftzahnes ausmündenden Ausführungsgang an. Die Drüsen sind von einer fibrösen, kapselartigen Membran überzogen, in welche die Sehnen des Musculus masseter teilweise übergehen, so daß bei der Kontraktion des genannten und unter Mitwirkung anderer Muskeln der dadurch auf die Drüsen ausgeübte Druck die Entleerung des Giftes nach außen veranlaßt.

Die „ungiftigen" Schlangen besitzen ebenfalls eine Ohrspeicheldrüse (Parotis) und Oberlippendrüsen, deren Sekrete mehr oder weniger giftig sind; nur fehlen diesen die für die Einverleibung des Giftes nötigen Vorrichtungen, d. h. die Giftzähne.

Besondere Beachtung verdient die Tatsache, daß das Blut bzw. das Serum auch ungiftiger Schlangen qualitativ wie das Sekret ihrer Speicheldrüsen (Giftdrüsen) wirkt. Es drängt sich daher der Schluß auf, daß die im Blute vorhandene und somit im ganzen Organismus der Schlangen verteilte giftige Substanz von den Speicheldrüsen „selektiv" aus dem Blute aufgenommen und sezerniert wird, nicht aber infolge einer „inneren Sekretion" der betreffenden Drüsen von diesen in das Blut übergeht.

Die Vorgänge und die an den Giftdrüsen bei der Sekretion des Giftes zu beobachtenden Erscheinungen, zum Teil unter dem Einflusse pharmakologischer Agenzien, sind von *Lindemann*[1]), *Reichel*[2]), *Launy*[3]) u. a. studiert und beschrieben worden.

Die Mengen des abgesonderten Giftes stehen in einem gewissen Verhältnis zur Größe der Giftdrüsen, somit im allgemeinen zur Größe der betreffenden Schlange. Bei einem bestimmten Tiere ist die Menge des auf einmal bei einem Bisse gelieferten Giftes eine schwankende, je nachdem es längere oder kürzere Zeit nicht gebissen hat, doch sind auch andere, schwer zu bestimmende Einflüsse von Bedeutung für diese Verhältnisse, so vielleicht das Allgemeinbefinden der Schlange, nervöse Einflüsse, die Heftigkeit des Bisses, die Temperatur der Umgebung, Wasser- und Nahrungsaufnahme und die Art der Nahrung sowie die Gefangenschaft.

---

[1]) Archiv f. mikr. Anatomie. Bd. 53. S. 313—321 (1898).

[2]) Morpholog. Jahrb. Bd. 8 (1882).

[3]) Contribution à l'étude des Phénomènes nucléaires de la Sécrétion (Cellules à venin. — Cellules à Enzyme). Thèse de Paris (1903). Literatur.

Über die Natur der Schlangengifte.

Physikalische und chemische Eigenschaften.

Das frische, der lebenden Schlange entnommene Sekret stellt eine klare, etwas visköse Flüssigkeit von hell- bis dunkelgelber, manchmal auch grünlicher Farbe und neutraler oder schwach saurer Reaktion dar, deren spezifisches Gewicht zwischen 1·030 und 1·050 schwankt. Es löst sich in Wasser zu einer trüben, opaleszierenden Flüssigkeit von sehr schwachem, fadem Geruch, die beim Stehen einen mehr oder weniger voluminösen Niederschlag fallen läßt. Dieser besteht aus Eiweiß oder eiweißartigen Stoffen, hauptsächlich Globulinen, Mucin, Epithelzellen oder deren Trümmern.

Die wässerigen Lösungen schäumen beim Schütteln stark und zersetzen sich unter der Einwirkung von Fäulnis- oder anderen Bakterien unter Entwicklung von Ammoniak und von höchst unangenehm riechenden, flüchtigen Fäulnisprodukten, je nach der Temperatur, nach längerer oder kürzerer Zeit, wobei die Wirksamkeit der Lösung allmählich abnimmt und schließlich ganz verloren gehen kann.

Beim Eintrocknen der Schlangengifte bei niederer Temperatur, am besten im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure oder geschmolzenem Chlorcalcium, hinterbleibt eine dem Gewichte nach sehr stark variierende Menge Trockensubstanz, deren quantitative Zusammensetzung außerordentlichen Schwankungen unterworfen ist. Die Hauptbestandteile eines derartigen Trockenrückstandes, welcher, ohne an Wirksamkeit einzubüßen [1]), anscheinend unbegrenzt lange Zeit aufbewahrt werden kann, sind: 1. durch Hitze koagulierbares Eiweiß (Albumin, Globulin); 2. durch Hitze nicht koagulierbare Eiweißderivate (Albumosen und sogenannte Peptone); 3. Mucin oder mucinartige Körper; 4. Fermente; 5. Fett; 6. geformte Elemente: Epithel der Drüsen und der Mundhöhle und Epitheltrümmer; 7. Mikroorganismen, welche wohl Zufälligkeiten ihre Anwesenheit verdanken; 8. Salze, Chloride und Phosphate von Calcium, Magnesium und Ammonium.

Der Trockenrückstand hat etwa die Farbe des ursprünglichen frischen, nativen Giftsekretes und hinterbleibt gewöhnlich in Form von Schüppchen oder Lamellen, welche kristallinische Struktur des Rückstandes vortäuschen können.

Aus dem nativen Gifte oder aus einer Lösung des eingetrockneten Giftes in Wasser fällt Alkohol bei genügender Konzentration die wirksame

---

[1]) Diese Tatsache gebietet beim Hantieren mit Giftzähnen von Schlangen oder auch Schädeln mit erhaltenen Giftzähnen in Museen, im Laboratorium usw. Vorsicht, weil an den Zähnen eingetrocknetes, aber noch wirksames Gift anhaften kann und weil es bei etwaigen, ziemlich leicht erfolgenden Verletzungen mit den sehr spitzen Zähnen zur Resorption von Gift und schweren Vergiftungserscheinungen kommen kann; sogar längere Zeit in Alkohol aufbewahrte Giftschlangen können noch zu Vergiftungen Veranlassung geben, wie der Fall eines Assistenten am Museum in Petersburg zeigt. Der Betreffende starb infolge einer Verletzung durch den Zahn einer Giftschlange, mit welcher er in unvorsichtiger Weise hantiert hatte.

Substanz aus. Der Niederschlag ist in Wasser löslich und hat, wenn der Alkohol nicht durch zu langes Einwirken Koagulation des Eiweißes und Einschluß eines Teiles der Giftsubstanz in dem geronnenen Eiweiß verursachte, an Wirksamkeit nicht eingebüßt.

Die Einwirkung der Wärme auf die Schlangengifte ist bei den von verschiedenen Schlangen stammenden Giften sehr verschieden.

Das Gift der Colubriden *(Naja, Bungarus, Hoplocephalus, Pseudechis)* kann Temperaturen bis 100° ausgesetzt werden und verträgt sogar kurzdauerndes Kochen, ohne daß seine Wirksamkeit abgeschwächt wird. Durch längeres Kochen oder Erhitzen auf Temperaturen über 100° wird die Wirksamkeit vermindert und schließlich bei 120° vernichtet.

Wenn man durch Erhitzen auf geeignete Temperaturen (75 bis 85°) die koagulierbaren Eiweißkörper des Colubridengiftes ausscheidet und das geronnene Eiweiß durch Filtration entfernt, so erhält man eine klare Flüssigkeit, welche die wirksame Substanz enthält und sich beim Kochen nicht mehr trübt. Der abfiltrierte und gewaschene Eiweißniederschlag ist nicht mehr giftig. Aus dem in den meisten Fällen noch Biuretreaktion gebenden Filtrate fällt Alkohol einen die wirksame Substanz enthaltenden Niederschlag, welcher sich auf Zusatz von Wasser wieder löst.

Das Viperngift *(Bothrops, Crotalus, Vipern)* ist gegen Temperatureinflüsse viel empfindlicher. Erwärmen bis zur Gerinnungstemperatur, etwa 70°, schwächt die Giftigkeit ab und bei 80 bis 85° wird diese vollkommen vernichtet. Das Bothropsgift verliert seine Wirksamkeit teilweise schon bei 65° *(Calmette)*.

Die Schlangengifte dialysieren nicht. In diesem Verhalten schließen sie sich den Eiweißkörpern eng an, deren bekanntere Reaktionen ihnen ebenfalls zukommen. Alle bisher untersuchten Schlangengifte geben die Biuret-, Millon- und Xanthoproteinreaktion und werden durch Sättigung ihrer Lösungen mit Ammonium- und Magnesiumsulfat abgeschieden; auch durch Schwermetallsalze werden diese Gifte gefällt.

Alkalien und Säuren beeinflussen bei gewöhnlicher Temperatur und bei nicht zu lange dauernder Einwirkung und mäßiger Konzentration die Wirksamkeit der Schlangengifte nicht.

Gegen oxydierende chemische Agentien scheinen dieselben jedoch sehr empfindlich zu sein. Die Wirksamkeit wird wesentlich herabgesetzt oder gänzlich aufgehoben durch Kaliumpermanganat *(Lacerda)*, Chlor (*Lenz*, 1832), Chlorkalk oder schneller noch durch unterchlorigsaures Calcium *(Calmette)*, Chromsäure *(Kaufmann)*, Brom, Jod (*Brainard*) und Jodtrichlorid *(Kanthack)*. Die genannten Körper hat man wegen dieser schädigenden oder zerstörenden Wirkungen auf das Gift auch therapeutisch zu verwenden gesucht.

Elektrolyse des Schlangengiftes vernichtet dessen Wirksamkeit, wahrscheinlich infolge der Bildung von freiem Chlor aus den Chloriden und von Ozon (Oxydation).

Bei Vermeidung jeglicher Temperatursteigerung wird das Schlangengift durch Wechselströme nicht verändert (*Marmier*[1]).

Der Einfluß des Lichtes, welcher beim trockenen Gifte gleich Null ist, macht sich nach *Calmette* beim nativen oder gelösten Gifte in der Weise bemerkbar, daß die Lösungen nach und nach weniger wirksam werden. Bei Luftzutritt bevölkern sich dieselben außerdem rasch mit den verschiedenartigsten Mikroorganismen, für welche das Schlangengift, wahrscheinlich wegen des Eiweißgehaltes und der darin enthaltenen Salze, ein guter Nährboden zu sein scheint und welche dann ihrerseits vielleicht die Zersetzung der wirksamen Bestandteile beschleunigen.

Durch Chamberland- oder Berkefeldfilter filtriert und bei niedriger Temperatur in gut verschlossenen Gefäßen aufbewahrt, sollen sich dagegen Giftlösungen mehrere Monate lang unverändert aufbewahren lassen.

Die **Konservierung von Giftlösungen** kann auch in der Weise geschehen, daß man ihnen in konzentriertem Zustande das gleiche Volumen Glycerin zusetzt. Indessen wird man wohl, besonders wenn es sich um später mit dem Gifte vorzunehmende chemische Untersuchungen handelt, dem Eintrocknen des nativen flüssigen Giftes und der Aufbewahrung desselben im trockenen Zustande den Vorzug geben.

Unsere Kenntnisse über die **chemische Natur der wirksamen Bestandteile** der giftigen Schlangensekrete sind noch sehr unvollkommen.

Sicher ist, daß es sich nicht um fermentartig wirkende Körper handelt, weil die Wirksamkeit der Fermente durch Erhitzen ihrer Lösungen auf Temperaturen, die die Schlangengifte unter Erhaltung ihrer Wirksamkeit noch vertragen, vernichtet wird und weil die Intensität der Schlangengiftwirkungen in einem direkten Verhältnisse zur einverleibten Menge des Giftes steht.

Seit den Untersuchungen von *Lucien Bonaparte* (1843) und von *S. Weir Mitchell* und *Reichert* (1876 und 1886), welche zuerst die chemische Natur, ersterer des Viperngiftes, letztere speziell des Klapperschlangengiftes kennen zu lernen suchten, wurde allgemein angenommen, daß die wirksamen Substanzen der Schlangengifte giftige Eiweißkörper oder den Eiweißkörpern nahestehende Derivate (Albumosen), sogenannte „Toxalbumine“ sind.

S. Weir Mitchell und *Reichert*[2]) fanden als wirksame Bestandteile des Klapperschlangengiftes verschiedene Globuline und ein „Pepton“.

C. J. Martin und *J. Mc Garvie Smith*[3]) isolierten aus dem Gifte der australischen „black snake“, Pseudechis porphyriacus, eine Heteroalbumose und eine Protalbumose, deren Wirkungen sie genauer untersuchten und mit denjenigen des nativen Giftes übereinstimmend fanden.

---

[1]) Annal. de l'Instit. Pasteur. T. **10**. p. 469 (1896).

[2]) Smithsonian „Contributions to Knowledge“. Researches upon the Venoms of Poisonous serpents. Washington 1886.

[3]) Proc. Roy. Soc. New South Wales. 1892 und 1895. Journal of Physiology. Vol. **15**. p. 380 (1895).

Die unter *Ehrlichs* Leitung ausgeführten Untersuchungen von *Preston Kyes*[1]) und von *Kyes* und *Sachs*[2]) erstrecken sich auf denjenigen Bestandteil des Kobragiftes, welcher seine Wirkungen auf das Blut und dessen geformte Elemente ausübt und welcher von *Kyes* in Form einer Verbindung mit Lecithin, einem sogenannten Lecithid, isoliert wurde. Die Zusammensetzung und die chemische Natur derartiger aus Kobragift und Lecithin dargestellten Verbindungen hat *Kyes*[3]) später genauer untersucht und dabei Verbindungen erhalten, welche bei der Elementaranalyse konstante prozentische Zusammensetzung und konstante physikalische Eigenschaften zeigten.

Die Untersuchungen von *P. Kyes* und *Kyes* und *Sachs* haben ergeben, daß der Bestandteil des Kobragiftes, welchem die hämolytische Wirkung zukommt, nicht ein sogenanntes „Toxalbumin" ist. Ich habe dann das auf das Zentralnervensystem wirkende Gift, in dessen Wirkungen bei dieser Vergiftung ohne Zweifel die Todesursache zu suchen ist, von den eiweißartigen Stoffen und anderen Bestandteilen des eingetrockneten Kobragiftes getrennt und chemisch und pharmakologisch genauer untersucht.[4])

Es gelingt also, den auf gewisse Gebiete des Zentralnervensystems lähmend und auf die peripheren, motorischen Endapparate curarinartig wirkenden Bestandteil des Kobragiftes in **eiweißfreiem** und **wirksamem** Zustande zu erhalten.

Diesen Körper, dessen Zusammensetzung der Formel $C_{17}H_{26}O_{10}$ entspricht, habe ich **Ophiotoxin** genannt.

Die aus stark wirksamen Lösungen des Ophiotoxins beim Einengen derselben zur Trockne erhaltenen Rückstände sind stickstofffrei. Das Ophiotoxin ist nicht flüchtig und dialysiert nicht. Wässerige Lösungen des Ophiotoxins schäumen stark beim Schütteln. Der Rückstand aus solchen Lösungen ist in Alkohol schwer, in Wasser unvollkommen löslich; in den übrigen gewöhnlichen Lösungsmitteln unlöslich. Bei der subkutanen Injektion des Ophiotoxins sind bedeutend größere Mengen erforderlich, um den gleichen Grad der Wirkung wie bei der intravenösen Injektion zu erzielen, vielleicht weil es bei ersterer Art der Einverleibung an Gewebseiweiß gebunden oder fixiert wird. Bei seiner intravenösen Einverleibung kommen die charakteristischen Wirkungen sehr rasch zustande, wie sie nach einer subkutan oder intravenös injizierten Lösung des ganzen Trockenrückstandes des Giftsekretes beobachtet werden.

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. Nr. 38 und 39 (1902); Nr. 42 und 43 (1903); Nr. 19 (1904). — Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **41**. S. 273 (1904).

[2]) Berl. klin. Wochenschr. Nr. 2 bis 4 (1903).

[3]) *Preston Kyes*, Über die Lecithide des Schlangengiftes. Biochemische Zeitschr. Bd. **4**. S. 99—123 (1907). — Bemerkungen über die Lecithidbildung. Biochemische Zeitschr. Bd. **8**. S. 42 (1908). Vgl. aber hierzu auch: *Ivar Bang*, Kobragift und Hämolyse. Biochemische Zeitschr. Bd. **11**. S. 521 (1908) und Bd. **18**. S. 441 (1909).

[4]) *E. St. Faust*, Über das Ophiotoxin aus dem Gifte der ostindischen Brillenschlange. Archiv f. exp. Path. und Pharmakologie. Bd. **56**. S. 236 (1907).

Aus dieser Tatsache geht hervor, daß der Eiweißkomponent des nativen Giftes auf die Resorptionsverhältnisse von Einfluß ist, d. h. die Resorption ermöglicht und begünstigt.

Aus meinen Untersuchungen geht ferner hervor, daß im nativen Gifte das Ophiotoxin wahrscheinlich salz- oder esterartig an Eiweiß oder eiweißartige Stoffe gebunden ist und daß es durch die Art der Bindung vor den in freiem oder ungebundenem Zustande leicht eintretenden und sein Unwirksamwerden herbeiführenden Veränderungen im Molekül geschützt ist.

Darstellung des Ophiotoxins.

10 *g* getrocknetes Kobragift werden mit 500 *cm*³ Wasser übergossen und über Nacht stehen gelassen, morgens die Flüssigkeit von dem ungelöst gebliebenen Anteil abfiltriert. Das Ungelöste ist im wesentlichen organischer Natur und besteht aus Epithelzellen oder Trümmern derselben. Das klare, hellgelb gefärbte Filtrat wird mit einer Lösung von neutralem Kupferacetat oder mit chemisch reinem, namentlich völlig eisenfreiem Kupferchlorid versetzt und dieser kupferhaltigen Lösung nach einiger Zeit verdünnte, etwa 5%ige Kali- oder Natronlauge tropfenweise zugegeben bis zur bleibenden, schwachen, aber deutlich erkennbaren alkalischen Reaktion, wobei die Flüssigkeit eine intensive Biuretfärbung annimmt und ein Niederschlag ausfällt, welcher zum größten Teil aus Kupferoxydhydrat besteht.

Wenn bei eingetretener alkalischer Reaktion auf Zusatz von Natronlauge keine weitere Fällung erfolgt, läßt man absitzen und filtriert dann von dem Niederschlage ab. In dem tief violett gefärbten Filtrate entsteht auf Zusatz von verdünnter Essigsäure ein Niederschlag von Eiweiß oder eiweißartigen Stoffen, welcher pharmakologisch vollkommen wirkungslos ist.

Der erste Kupferniederschlag wurde in schwach essigsäurehaltigem Wasser gelöst, die Lösung filtriert und das Filtrat durch vorsichtigen tropfenweisen Zusatz von Kali- oder Natronlauge alkalisch gemacht, wobei wiederum ein Niederschlag ausfällt, während die Flüssigkeit, in der Eiweißstoffe zurückbleiben, die Biuretfärbung zeigt. Man filtriert den Niederschlag nach dem Absitzen möglichst schnell ab. Das Filtrat hat nur noch eine sehr schwache Biuretfärbung, zuweilen auch keine mehr. Gegebenenfalls muß das Lösen in essigsäurehaltigem Wasser und die Fällung durch Alkali wiederholt werden.

Hat man auf diese Weise den Kupferkali- oder Kupfernatronniederschlag von biuretreaktiongebender Substanz und durch wiederholtes Waschen von überschüssigem Alkali befreit und neutral gewaschen, so handelt es sich dann darum, den gesuchten wirksamen Körper vom Kupfer zu befreien. Dieses kann nach einem der folgenden Verfahren geschehen.

A. Man spült den klebrigen, gelatinösen Niederschlag mit Wasser vom Filter in ein geeignetes Kölbchen von passender Größe, verteilt ihn durch

anhaltendes, kräftiges Schütteln in dem Wasser und leitet einen kräftigen Schwefelwasserstoffstrom in die den Niederschlag in möglichst feiner Suspension enthaltende Flüssigkeit. Durch einen kräftigen Luftstrom wird der Überschuß von Schwefelwasserstoff entfernt und nun vom gebildeten Schwefelkupfer abfiltriert.

Das wasserhelle, klare, biuretfreie Filtrat erweist sich beim Versuch am Kaninchen und am Frosch in demselben Sinne wirksam als die ursprüngliche, eiweißhaltige wässerige Lösung des nativen Giftes. Beide Tierarten zeigen die für das Kobragift charakteristische Lähmung, und das Kaninchen geht an Respirationsstillstand zugrunde. Bei beiden Tierarten muß aber die Einspritzung dieser eiweißfreien Giftlösung direkt in das Blut erfolgen, und auch dann ist die Wirkung einer der ursprünglichen, eiweißhaltigen Kobragiftlösung äquivalenten Menge dieser in quantitativer Hinsicht nicht gleich. Entweder enthält demnach das Filtrat vom Schwefelkupfer nicht die Gesamtmenge der in dem Kupferalkaliniederschlag enthaltenen Giftsubstanz, oder es ist ein Teil der letzteren durch die geschilderte Behandlungsweise verändert und unwirksam geworden.

Die quantitativ verschiedene, qualitativ jedoch gleiche Wirkung des eiweißfreien Filtrates vom Schwefelkupfer im Vergleich zur ursprünglichen Giftlösung ist höchst wahrscheinlich auf eine teilweise Veränderung der wirksamen Substanz, verursacht durch die angegebene Behandlung, zurückzuführen. Insbesondere fragte es sich, ob nicht vielleicht das Ophiotoxin durch die Alkaliwirkung bei gewöhnlicher Zimmertemperatur chemisch verändert wird und dadurch an Wirksamkeit verliert.

Das native, eiweißhaltige Kobragrift erleidet in 2%iger Lösung durch einstündige Einwirkung eines gleichen Volumens 5%iger Kalilauge bei Zimmertemperatur keine Veränderung seiner Wirksamkeit.

Ich habe die Versuche mit dem Kupferkaliverfahren bei niederer Temperatur wiederholt, indem alle Lösungen und Gefäße vorher auf 0° abgekühlt und die Filtrationen ebenfalls bei der Temperatur des schmelzenden Eises vorgenommen wurden. Die auf diese Weise erhaltenen eiweißfreien Lösungen des Ophiotoxins erwiesen sich beim Tierversuch ebenfalls weniger wirksam, als dem Volumen nach äquivalente Mengen der ursprünglichen Kobragiftlösungen. Dampft man derartige eiweißfreie, stark wirksame und neutral reagierende, wässerige Ophiotoxinlösungen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur ein, so pflegen diese Lösungen allmählich immer weniger wirksam zu werden und der schließlich in sehr geringer Ausbeute erhaltene, in Form eines amorphen, weißen Körpers in der Glasschale zurückbleibende Rückstand erwies sich mehrmals als vollkommen unwirksam. Einengen der wirksamen Lösung bei 0° im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure ändert hierbei an dem Endresultat nichts.

Beim Eindampfen wirksamer Lösungen des Ophiotoxins wird kein Stickstoff in Form basischer, flüchtiger Verbindung abgespalten. Das Ophiotoxin ist also sicher stickstofffrei, und das Unwirksamwerden beim Ein-

dampfen seiner Lösungen ist nicht durch Abspaltung von flüchtigen Stickstoffverbindungen bedingt.

* * *

Zur Vermeidung der durch Anhaften des Ophiotoxins am Schwefelkupfer[1]) oder durch Eindampfen der wässerigen Lösungen entstehenden Verluste an wirksamer Substanz habe ich weiter folgendes Verfahren eingeschlagen.

B. Der alkali- und biuretfreie, gewaschene Kupferniederschlag wird mit Alkohol vom Filter abgespült und zur vollständigen Entfernung von Wasser längere Zeit unter wiederholt gewechseltem Alkohol von 96⁰/₀ aufbewahrt. Durch vorsichtigen Zusatz alkoholischer Salzsäure zu dem überstehenden Alkohol und fleißigem Umschütteln des Alkohols wird der Kupferniederschlag zerlegt. Das hierbei gebildete Kupferchlorid löst sich im Alkohol, während das vorher an Kupfer gebundene Ophiotoxin, nunmehr in freiem Zustande, in Form von leichten, gelblichweißen Flocken im Alkohol ungelöst und suspendiert bleibt und sich dann allmählich absetzt. Die Ausscheidung des Ophiotoxins kann durch Zusatz von wasserfreiem, frisch destilliertem Äther beschleunigt und begünstigt werden, doch ist darauf zu achten, daß hierdurch nicht gleichzeitig Kupferchlorid abgeschieden wird. Man läßt das ausgeschiedene Ophiotoxin absitzen, entfernt durch Dekantieren den kupferchloridhaltigen Alkohol und wiederholt diesen Vorgang, bis der abdekantierte Alkohol sich chlorfrei erweist oder durch die Ferrocyankaliumprobe die Abwesenheit von Kupfer erkennen läßt. Nach nochmaliger Behandlung mit Alkohol und Absitzenlassen des leichtflockigen Ophiotoxins löst man dasselbe im Wasser. Die auf das ursprüngliche Volumen der angewandten nativen Kobragiftlösung gebrachte Lösung erweist sich bei intravenöser Injektion als wirksam, ist aber jener an Wirksamkeit quantitativ nicht gleich.

Das freie, nicht mehr wie in dem nativen Kobragift an Eiweiß gebundene Ophiotoxin wird also durch Einwirkung von Alkali, sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei 0⁰ verändert; schon länger dauernde Einwirkung von Wasser genügt, um Veränderungen im Molekül, die durch Unwirksamwerden des Ophiotoxins kenntlich werden, hervorzurufen.

Es gelingt also auch nach diesem Verfahren, eiweißfreie und wirksame Lösungen des Ophiotoxins zu gewinnen, nicht aber letztere ohne Beimengung unwirksam gewordener Substanz zu erhalten.

Die oben geschilderten Verhältnisse und die angegebenen Eigenschaften des Ophiotoxins veranlaßten mich, die unsichere und jedenfalls nur mit großen Verlusten an wirksamer Substanz auszuführende Dar-

---

[1]) Das Anhaften kolloidaler Stoffe an den verschiedensten in ihren wässerigen Lösungen erzeugten Niederschlägen ist eine häufig beobachtete und oft sehr störende Erscheinung, wodurch die Ausbeuten an gesuchter, reiner Substanz stark herabgesetzt werden können. Vgl. *L. Rosenthaler,* Über Sapotoxine. Habil.-Schrift. Straßburg 1900.

stellungsmethode zu verlassen und anschließend an Beobachtungen früherer Autoren die Reindarstellung des Ophiotoxins auf anderem Wege zu erreichen.

Die die Biuretreaktion gebenden Bestandteile des Kobragiftes bestehen aus Eiweiß und aus albumose- oder peptonartigen Eiweißderivaten, welche durch Wärmewirkung nicht koaguliert werden. Ein Teil der in dem Giftsekret enthaltenen Eiweißstoffe kann also durch Erhitzen auf geeignete Temperatur und nachherige Filtration entfernt werden. Der auf das Nervensystem wirkende Bestandteil des Kobragiftes erleidet durch 15 Minuten langes Erhitzen auf 90° in wässeriger, nicht zu verdünnter Lösung keine Verminderung seiner Wirksamkeit.

C. 10 *g* eingetrocknetes Kobragift werden in 100 *cm*³ Wasser gelöst, mit Essigsäure sehr schwach angesäuert und dann auf dem Wasserbade 15 Minuten auf 90—95° erhitzt, während man gleichzeitig Kochsalz bis zur Sättigung einträgt. Hierbei scheidet sich die Hauptmenge des in dem nativen Kobragift enthaltenen Eiweißes in Form von groben Flocken aus, und die Flüssigkeit läßt sich nach dem Absitzen des ausgeschiedenen Eiweißes leicht und schnell abfiltrieren. Das auf dem Filter gesammelte Eiweiß ist nach einmaligem Auswaschen mit Wasser vollkommen wirkungslos.

Durch die Sättigung der Flüssigkeit mit Kochsalz wird die Abscheidung des Eiweißes eine vollständigere und die Filtration wesentlich erleichtert und beschleunigt. Magnesium- und Ammoniumsulfat sind zu diesem Zwecke beim Kobragift nicht zu gebrauchen, weil durch sie, zusammen mit Eiweiß, auch die Hauptmenge des Ophiotoxins gefällt wird.

Das hellgelb gefärbte Filtrat vom geronnenen Eiweiß ist ebenso wirksam wie die ursprüngliche Giftlösung. Es enthält aber neben dem Ophiotoxin und anderen Stoffen noch biuretartig reagierende Substanzen.

Zur Entfernung des zugesetzten Kochsalzes und anderer in dem nativen Gift enthaltener anorganischer Salze wird das Filtrat auf den Dialysator gebracht und so lange dialysiert, bis in der Flüssigkeit Chlor nicht mehr nachweisbar ist. Das Ophiotoxin dialysiert nicht. Geringe Mengen der die Biuretreaktion gebenden Substanzen gehen indessen durch die Membran und es kann im günstigsten Falle vorkommen, daß durch ausgiebige Dialyse allein schon eiweißfreie und stark wirksame Ophiotoxinlösungen erhalten werden; doch scheint die Zersetzlichkeit und die Veränderlichkeit des Ophiotoxins mit abnehmendem Gehalt seiner Lösungen an biuretartig reagierenden Stoffen zuzunehmen. Es ist deshalb nicht vorteilhaft, die Dialyse wochenlang fortzusetzen, um auf diesem Wege die Entfernung der letzten Spuren von biuretartig reagierender Substanz zu erreichen. Es empfiehlt sich vielmehr, sobald die auf dem Dialysator befindliche Flüssigkeit chlorfrei ist, diese in den Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur über Schwefelsäure zu bringen und das durch die Dialyse auf durchschnittlich 800 *cm*³ gestiegene Volumen mindestens auf das Volumen des ursprünglichen Filtrates, besser und bequemer für die folgenden Manipulationen durch Eindampfen unter den oben genannten

Bedingungen auf etwa 50 cm^3 zu bringen. Hierbei pflegen die Lösungen sich mehr oder weniger zu trüben; zuweilen kommt es auch zur Ausscheidung eines geringfügigen Niederschlags, welcher die Biuretreaktion gibt, aber nicht giftig ist.

Zur Entfernung der biuretartig reagierenden Substanzen wird die eingeengte und filtrierte Flüssigkeit vorsichtig mit einer 10%igen Lösung von **Metaphosphorsäure** versetzt. Es entsteht auf Zusatz der genannten Säure ein grobflockiger Niederschlag, der sich rasch absetzt und dann gut abfiltrieren läßt. Ein Überschuß des Fällungsmittels ist sorgfältig zu vermeiden, weil der Niederschlag im Überschuß etwas löslich ist und die Entfernung der überschüssigen Metaphosphorsäure beträchtliche Schwierigkeiten macht. Doch muß nach vollständiger Ausfällung der die Biuretreaktion gebenden Stoffe aus gleich zu erörternden Gründen in der überstehenden klaren Flüssigkeit so viel freie Metaphosphorsäure vorhanden sein, daß eben noch schwach saure Reaktion besteht.

Die von dem Metaphosphorsäureniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit ist biuretfrei und äußerst wirksam sowohl beim Frosch als auch beim Kaninchen und beim Hunde, doch muß die Einverleibung des Giftes durch direkte Einspritzung der Giftlösung in das Blut geschehen.

Bei den weiteren Versuchen zur Isolierung des Ophiotoxins in fester Form zwecks Vorbereitung desselben zur Elementaranalyse zeigte sich dann, daß das Einengen seiner wässerigen Lösungen nur dann ohne Gefahr mehr oder weniger weitgehender Zersetzung und Abnahme seiner Wirksamkeit erfolgen kann, wenn die Lösungen sehr schwach sauer reagieren. Abgesehen von ihrer sauren Natur, scheint aber die Metaphosphorsäure noch durch andere, vorläufig unbekannte Eigenschaften oder Umstände das Ophiotoxin vor chemischen Veränderungen beim Eindampfen seiner wässerigen Lösungen zu schützen, denn sie kann hier nicht durch andere beliebige Säuren ersetzt werden. Schwefel-, Salz-, Salpeter- und Orthophosphorsäure vermögen ebensowenig wie Weinsäure und Oxalsäure das Ophiotoxin in wässerigen Lösungen beim Eindampfen an der Luft und im Vakuum vor Zersetzungen zu schützen.

Aus den in schwach metaphosphorsaurer Lösung auf ein Volumen von etwa 10—15 cm^3 eingedampften eiweißfreien und stark wirksamen Lösungen des Ophiotoxins fällt Alkohol die wirksame Substanz in Form grober, weißer Flocken, die sich nur sehr langsam absetzen. Man sammelt deshalb die Substanz am vorteilhaftesten in der Weise, daß man die Alkoholfällungen in hohen und relativ engen Reagenzgläsern vornimmt. Die an den Wandungen des Reagenzglases anhaftenden Flocken lassen sich durch schnell rotierende Bewegungen des Glases von diesen loslösen und sinken dann langsam zu Boden.

Hat man größere als zur Fällung der die Biuretreaktion gebenden Substanzen und zur Erhaltung der sehr schwach sauren Reaktion nötige Mengen Metaphosphorsäure zugesetzt, so wird bei einer gewissen Alkohol-

konzentration auch Metaphosphorsäure gefällt. Das Ophiotoxin fällt jedoch zuerst und seine flockige Fällung ist leicht von der in Tropfenform erfolgenden und eine milchige Trübung der Flüssigkeit verursachenden Fällung der Metaphosphorsäure zu unterscheiden.

Die überstehende wässerig-alkoholische Flüssigkeit wird nun von dem Ophiotoxin vorsichtig abgehebert oder abpipettiert, der Niederschlag in möglichst wenig destilliertem Wasser gelöst und durch Zusatz von Alkohol wieder gefällt. Diese Manipulationen werden so oft wiederholt, bis in der überstehenden Flüssigkeit Phosphor nicht mehr nachzuweisen ist. Zur Vermeidung von Substanzverlusten tut man gut, Lösung und Fällung stets in demselben Gefäß vorzunehmen; auch empfiehlt es sich, die schließliche Fällung des Ophiotoxins in demselben Reagenzglase zu belassen und in diesem zu trocknen, weil die feuchte Substanz beim Trocknen am Filter hartnäckig festklebt und nur unter großem Verlust an reiner Substanz und unter unvermeidlicher Verunreinigung durch Papierfasern von ersterem entfernt werden kann.

Das **Trocknen** geschah im Vakuum über Schwefelsäure bei einer Temperatur von 35—40°[1]; Gewichtskonstanz der Präparate wurde unter den genannten Bedingungen nach 8—10tägigem Trocknen erreicht.

Die analysenfertige Substanz stellt ein leichtes, schwach gelblich gefärbtes, amorphes Pulver dar. Sie hinterläßt beim Glühen auf dem Platinblech zunächst eine voluminöse Kohle, welche ohne Hinterlassung eines Rückstandes verbrennt. Sie enthält keinen Stickstoff. Die Substanz löst sich nach scharfem Trocknen nur sehr langsam in Wasser. Die wässerige Lösung erweist sich beim Tierversuch bei intravenöser Einverleibung sehr wirksam. Zusatz von Natronlauge zu wässerigen Lösungen reinen Ophiotoxins macht das Ophiotoxin sehr bald unwirksam.

Die Elementaranalyse des Ophiotoxins ergibt für dasselbe die empirische Formel $C_{17} H_{26} O_{10}$.

Die wässerigen Lösungen des Ophiotoxins reagieren auf Lackmus sehr schwach sauer. Natriumkarbonat wird durch Ophiotoxin nicht zerlegt; das letztere ist also eine schwächere Säure als Kohlensäure und vermag diese nicht aus ihren Salzen auszutreiben. Aus seinen wässerigen Lösungen wird das Ophiotoxin durch Sättigung der Flüssigkeit mit Ammoniumsulfat abgeschieden; Kochsalz und Natriumsulfat fällen es dagegen nicht. Schwermetallsalze — Kupfer, Blei, Quecksilber — fällen dasselbe in alkalischer, nicht aber in saurer Lösung.

Die oben aufgestellte empirische Formel des Ophiotoxins, insbesondere sein hoher Sauerstoffgehalt, erinnern an die Zusammensetzung bekannter pflanzlicher Glykoside und es fragt sich, ob nicht ein Teil des Sauerstoffs einem im Molekül vorhandenen Kohlehydratkomplex eigen ist, in dem

---

[1]) Man bedient sich zum Trocknen kleinerer Mengen wärmeempfindlicher Substanzen über konzentrierter Schwefelsäure bei beliebiger, niederer Temperatur zweckmäßig des von der Firma Franz Müller, Geisslers Nachf., Bonn hergestellten Trockenapparates nach *Hans Meyer*.

Ophiotoxin also ein tierisches Glykosid vorliegt. Ich habe wässerige Ophiotoxinlösungen mit konzentrierter Salzsäure längere Zeit, bis zu einer Stunde, gekocht, konnte aber in keinem Falle nach Zusatz von Natronlauge und Kupfersulfat zur erhitzten, stark sauren Flüssigkeit Reduktion des Kupferoxyds zu Oxydul beobachten. Das Ophiotoxin enthält also keine Gruppe, die bei einstündigem Kochen mit Salzsäure reduzierenden Zucker gibt; allenfalls könnte es sich um einen nur schwer reduzierenden Zucker liefernden Kohlehydratkomplex handeln. Die Schwerlöslichkeit des Ophiotoxins in Alkohol könnte durch eine derartige Kohlehydratgruppe, deren Nachweis unmittelbar nicht gelingt, bedingt sein.

Pharmakologische Wirkungen und Nachweis des Ophiotoxins.

In Ermangelung charakteristischer chemischer Reaktionen des Ophiotoxins ist man für dessen Nachweis auf den Tierversuch angewiesen.

Injiziert man einem Kaninchen 0·085—0·10 *mg* Ophiotoxin pro Kilogramm Körpergewicht in eine Ohrvene, so sind im Verlauf der ersten 12—20 Minuten nach der Injektion keinerlei äußerlich erkennbare Wirkungen zu beobachten.

Das Tier verharrt ruhig im Käfig oder in normaler hockender Stellung auf seiner Unterlage und reagiert prompt auf mechanische Reize durch Abwehrbewegungen oder Fluchtversuche. Nach Ablauf der genannten Zeit beobachtet man zunächst Veränderungen in der **Respiration,** welche weniger frequent und zeitweise auffallend vertieft wird. Gleichzeitig bemächtigt sich des Tieres eine nicht zu verkennende Mattigkeit, die Fortbewegung scheint erschwert und erfolgt nur langsam unter scheinbar mühsamem Anziehen der gestreckten Hinterextremitäten, welche auch auf Kneipen der Hinterpfoten träger als normal reagieren. Diese **Lähmungserscheinungen** machen sich dann auch bald an den vorderen Extremitäten und dem Vorderteil des Körpers bemerkbar, das Tier liegt mit gespreizten Beinen und zur Seite geneigtem oder auf die Unterlage gestütztem Kopf ganz ruhig, während die Frequenz und die Tiefe der Atmung allmählich abnehmen, bis schließlich, etwa 45—60 Minuten nach der Injektion, die Respiration zum Stillstand kommt und der Tod in soporösem Zustande erfolgt. Nach Eintritt des Respirationsstillstandes schlägt das **Herz** noch einige Zeit fort.

Beim Hunde kommt die periphere Lähmung nicht in dem Maße wie beim Kaninchen zustande. Die kleinsten tödlichen Mengen von Ophiotoxin sind beim Hunde etwas größer als beim Kaninchen. Nach meinen Versuchen töten **0·10—0·15 *mg* Ophiotoxin** pro Kilogramm Hund bei Einspritzung in das Blut in etwa 45—50 Minuten.

Beim Frosche genügen 0·05 *mg* Ophiotoxin in die Vena abdominalis injiziert, um das Tier nach 10 Minuten vollkommen zu lähmen. Der Tod erfolgt in der Regel aber erst nach 12—16 Stunden.

Das Herz schlägt noch kräftig, wenn die vollständige Lähmung des Tieres bereits eingetreten ist.

Das reine Ophiotoxin wirkt also nach seiner Resorption auf das Nervensystem; in erster Linie auf diejenigen Apparate des Zentralnervensystems, welche die Respiration beeinflussen und regulieren. Diese erfahren eine Herabsetzung ihrer Funktionsfähigkeit, die bis zur vollständigen Lähmung vorschreitet, und der **Tod** erfolgt beim **Warmblüter** durch **Respirationsstillstand,** während beim Frosche die allgemeine Lähmung des Zentralnervensystems mit einer curarinartigen Lähmung der motorischen Endapparate einhergeht und der Tod durch erstere bedingt ist. Die Vergiftungserscheinungen gleichen also sowohl beim Warmblüter als auch beim Kaltblüter denjenigen einer fortschreitenden allgemeinen Parese und schließlicher allgemeiner Paralyse.

Nach subkutaner Injektion geringerer Mengen Ophiotoxin, 2 *mg* beim Kaninchen, 4 *mg* beim Hund, erfolgte der Tod nach 36—72 Stunden, nachdem an der Injektionsstelle Rötung, Schmerzhaftigkeit, ödematöse Schwellung, in einzelnen Fällen mit hämorrhagischer Infiltration der Gewebe und aseptischer Abszeßbildung einhergehend, sich entwickelt haben.

Das reine Ophiotoxin vermag bei genügend langer Wirkungsdauer die roten Blutkörperchen gewisser Tierarten, wenigstens im Reagenzglase, zu lösen. Diese Wirkung kann nicht auf einer Beimengung und Verunreinigung durch „Hämotoxin“ beruhen, weil letzteres nach den Angaben der Autoren durch Erwärmen auf 90° zerstört oder verändert wird und seine Wirksamkeit einbüßt.

Das Ophiotoxin ist derjenige Bestandteil des Kobragiftes, welcher auf das Nervensystem wirkt und beim Warmblüter durch Lähmung des Respirationszentrums den Tod herbeiführt. Beim Kaltblüter (Frosch) ist neben der zentralen Lähmung auch noch eine curarinartige Lähmung der motorischen Endapparate nachzuweisen. Die lokalen Wirkungen des Ophiotoxins, zu denen auch die blutkörperchenlösende Eigenschaft gehört, sind nur Begleiterscheinungen, sogenannte „Nebenwirkungen“, und kommen als Todesursache nicht in Betracht.

Mit den unter dem Sammelnamen der „Sapotoxine“ bekannten, im Pflanzenreich weit verbreiteten Stoffen hat das Ophiotoxin folgende Eigenschaften und Wirkungen gemein:

1. Die Löslichkeit in Wasser zu schäumenden Lösungen und die Unlöslichkeit in Äther.

2. Die schwere Resorbierbarkeit von Schleimhautflächen (Magen, Darm).

3. Die lokalen Wirkungen nach der Injektion in das Unterhautzellgewebe, welche hier wie dort in Schwellung, Rötung, Blutaustritt, Schmerzhaftigkeit der Injektionsstelle und deren Umgebung und der manchmal eintretenden Entwicklung aseptischer Abszesse bestehen.

4. Die blutkörperchenlösende Eigenschaft, Hämolyse.

5. Die Wirkungen auf das Zentralnervensystem, insbesondere auf das Respirationszentrum.

6. Die zentralen Wirkungen der Sapotoxine kommen, wie das auch beim Ophiotoxin der Fall ist, entweder nur nach der Injektion in das

Blut oder nach der subkutanen Einspritzung relativ großer Mengen zustande.

7. Sapotoxine sind wie das Ophiotoxin stickstofffrei.

8. Sapotoxine und Ophiotoxin dialysieren nicht.

9. Beide sind amorphe, kolloidale Substanzen, sie kristallisieren sehr schwer oder überhaupt nicht.

Dagegen unterscheidet sich das Ophiotoxin von den meisten Sapotoxinen durch:

1. Seine Unlöslichkeit in Alkohol.

2. Das Ophiotoxin ist kein Glykosid, jedenfalls enthält es keine unmittelbar nachweisbare reduzierende Kohlehydratgruppe.

3. Die am Kaltblüter beobachtete curarinartige Wirkung des Ophiotoxins fehlt den Sapotoxinen.

* * *

Die empirische Zusammensetzung des Ophiotoxins ist, abgesehen von einem Atom Wasserstoff weniger, die gleiche wie diejenige der Quillajasäure, welche aber ein Glykosid ist. Doch deutet der hohe Sauerstoffgehalt des Ophiotoxins darauf hin, daß in ihm wohl auch eine Kohlehydratgruppe enthalten ist, die aber keinen reduzierenden Zucker liefert. Weiter erinnert die oben für das Ophiotoxin berechnete und aufgestellte Formel an ein von mir rein dargestelltes, nicht glykosidisches und stark wirksames tierisches Stoffwechselprodukt, das in dem Hautdrüsensekret der Kröte enthaltene Bufotalin.[1]) Ophiotoxin und Bufotalin enthalten nach meinen Analysen die gleiche Anzahl von Kohlenstoffatomen, aber das erstere gerade doppelt so viel Sauerstoffatome als das letztere. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß das Kohlenstoffskelett der beiden Verbindungen das gleiche ist. Möglicherweise sind in dem Ophiotoxin mehr Hydroxylgruppen enthalten als in dem Bufotalin. Eine derartige Annahme würde in ungezwungener Weise den Mehrgehalt des Ophiotoxins an Sauerstoff und seine größere Labilität in chemischer Beziehung gegenüber dem Bufotalin, damit aber wahrscheinlich auch seine viel größere Wirksamkeit erklären. Die Labilität und die hochgradige chemische Reaktionsfähigkeit mehrfach hydroxylierter Verbindungen ist sowohl bei den aliphatischen als auch bei den aromatischen Verbindungen bekannt. Vielleicht handelt es sich um eine Analogie der Stoffwechselvorgänge beider diese Stoffe produzierenden Tierklassen — der Amphibien und der Reptilien. Die Ähnlichkeiten der Stoffe der Digitalingruppe mit den Sapotoxinen, sowohl in chemischer als auch in pharmakologischer Beziehung, bilden einen weiteren Stützpunkt für diese Annahme. Es erscheint daher berechtigt, das Ophiotoxin als ein **tierisches Sapotoxin** anzusprechen und dasselbe in die pharmakologische Gruppe der Sapotoxine einzureihen.

---

[1]) Vgl. unten S. 847.

Nachdem ich bei meinen Untersuchungen über das Krötengift nachgewiesen habe, daß das Bufotalin wahrscheinlich ein Oxydationsprodukt des Bufonins, eines im Organismus der Kröte vorkommenden Homologons des menschlichen Cholesterins ist, wäre es von besonderem vergleichend physiologisch-chemischem Interesse, zu untersuchen, ob im Schlangenorganismus sich nicht auch ein dem Bufonin der Kröte ähnliches, den Ophidiern aber eigentümliches, cholesterinartiges Stoffwechselprodukt findet, welches vielleicht durch Oxydation das äußerst wirksame Ophiotoxin liefern könnte.

Wirkungen der Schlangengifte auf das Blut.

Die Wirkungen der Schlangengifte [1]) auf das Blut sind höchst komplizierte und betreffen sowohl die geformten Elemente als auch das Plasma.

a) Einfluß auf die Gerinnbarkeit des Blutes. Hinsichtlich dieser Wirkung der Schlangengifte zerfallen dieselben in folgende Kategorien:

1. Koagulierende oder koagulationsfördernde Schlangengifte.
2. Koagulationshemmende oder -hindernde Schlangengifte.

1. Koagulationsfördernde Schlangengifte. *Noc* [2]) hat im Laboratorium von *Calmette* neuerdings Versuche über diese Wirkungen verschiedener Schlangengifte angestellt und konnte die Angaben früherer Autoren über die koagulierende Wirkung der Vipergifte vollkommen bestätigen. Diese wird durch Erwärmen der Giftlösungen abgeschwächt oder ganz aufgehoben. Auch mit Oxal- oder Zitronensäure versetztes Plasma wird durch die genannten Giftsekrete zur Gerinnung gebracht. *Noc* hat die quantitativen und zeitlichen Verhältnisse bei dieser Wirkung einiger Vipergifte genauer untersucht.

2. Koagulationshemmende Schlangengifte. In diese Gruppe gehören die Giftsekrete aller Colubriden und als Ausnahmen die Gifte einiger nordamerikanischer Crotaliden, *Ancistrodon piscivorus* und *A. contortrix*. Dieselben heben die Gerinnungsfähigkeit des Blutes auf [3]), sowohl in vitro als auch im Organismus, im letzteren Falle jedoch nur dann, wenn eine genügend große Menge des Giftes einverleibt wurde. Ein eigenartiges Verhalten in dieser Hinsicht zeigt nach *C. J. Martin* [4]) das Gift der australischen Colubridenspezies, *Pseudechis porphyriacus*, welches bei der intravenösen Injektion von großen Mengen im Tierexperiment oder nach dem Biß kleiner Tiere durch eine Schlange, momentan intravaskuläre Gerinnung des Blutes bewirkt, dagegen bei der Injektion von kleinen Mengen in das Blut die Gerinnung vollkommen aufhebt. Die Injektion weiterer Mengen

---

[1]) Unter „Schlangengift" ist hier das Sekret der Giftdrüsen und nicht ein einzelner wirksamer Bestandteil zu verstehen.

[2]) Sur quelques Propriétés physiologiques des différents Venins des Serpents. Annal. de l'Institut Pasteur. T. **18**. p. 387—406 (1904).

[3]) Vgl. hierzu *P. Morawitz*, Über die gerinnungshemmende Wirkung des Kobragiftes. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **80**. S. 340—355 (1904). Literatur.

[4]) On the physiological action of the Venom of the Australian Black Snake. Read before the Royal Society of New South Wales. July 3. 1895.

des Giftes bewirkt dann keine Gerinnung des Blutes. (Positive und negative Phase der Blutgerinnung.)

b) Wirkung der Schlangengifte auf die roten Blutkörperchen. Hämolyse. Die Schlangengifte haben mit einer ganzen Anzahl zum Teil chemisch genau charakterisierter Stoffe (Sapotoxin, Gallensäuren, Solanin, Ölsäure, Helvellasäure) die Eigenschaft gemein, auf die roten Blutkörperchen in der Weise einzuwirken, daß das Hämoglobin aus diesen austritt.

Über das Wesen dieses Vorganges und der hierher gehörigen Wirkungen verschiedener Schlangengifte liegen eingehende Untersuchungen[1]) aus letzter Zeit vor. Die hämolytische Wirkung eines bestimmten Schlangengiftsekretes ist bei verschiedenen Blutarten eine quantitativ wechselnde.

c) Dasselbe gilt von der mit dem Namen „Agglutination" bezeichneten Wirkung mancher Schlangengifte. Diese Wirkung, welche auch gewissen Bakterientoxinen eigen ist, äußert sich in dem Zusammenkleben (Agglutinieren) der roten Blutkörperchen.

d) Anders verhält es sich vielleicht mit dem von *S. Flexner* und *H. Noguchi*[2]) nachgewiesenen und mit dem Namen „Hämorrhagin" bezeichneten, aber nicht isolierten Bestandteile mancher Schlangengifte, welcher seine Wirkungen auf das Gefäßendothel entfalten soll. Die Folgen der Wirkungen eines derartigen Körpers könnten begreiflicherweise zu schweren Störungen im Organismus führen, sei es durch Veränderungen in der Gefäßwand selbst oder durch Blutaustritt infolge der letzteren. *Flexner* und *Noguchi* fassen das „Hämorrhagin" als ein spezifisch oder elektiv auf Endothelzellen wirkendes „Cytolysin" auf.

e) Schließlich findet sich in verschiedenen darauf untersuchten Schlangengiften angeblich noch ein „Thrombokinase" genanntes Ferment, welches in eigenartiger Weise auf das Fibrinferment „aktivierend" wirken soll.

---

[1]) *P. Kyes* und *Kyes* und *Sachs*, Vgl. Anmerkung 1 und 2 auf 831. — *Kanthack*, Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army of India. Part 9 (1895) and Part 11 (1898). — *Olinto Pascucci*, Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die Hämolyse. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **6**. S. 543—566 (1905). — *Stephens* and *Myers*, Brit. med. Journ. p. 621 (1898). — *Myers*, Journ. of Path. and Bact. Vol. **6**. p. 415 (1899/1900). — *Stephens*, ibid., Vol. **6**. p. 273 (1899/1900). — *Calmette*, Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. T. **134**. p. 1446 (1902). — *G. Lamb*, On the action of the Venoms of the Cobra and of the Daboia on the red blood corpuscles and on the blood plasma. Scientific Memoirs by officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India. Nr. 4. Calcutta (1903). — *S. Flexner* und *S. Flexner* und *H. Noguchi*, Vgl. unten Anm. 2. — *G. Lamb*, Indian Med. Gaz. Vol. **36**. p. 443 (1901). — *C. Phisalix*, Compt. rend. de la soc. de biol. T. **51**. p. 834. 865 (1899). — *C. J. Martin* and *Mc G. Smith*, Journ. and Proc. Royal Soc. of New South Wales. Vol. **26**. p. 240 (1892). — *Noguchi*, Journ. of Exp. Med. Vol. **7**. p. 191—222 (1905). — *H. Noguchi*, On extracellular and intracellular Venom activators of the blood, with especial reference to lecithin and fatty acids and their compounds. Journ. of experim. Med. Vol. **9**. p. 436 (1907).

[2]) Snake Venom in Relation to Haemolysis, Bacteriolysis and Toxicity. Univ. of Pennsylvania Med. Bulletin. Vol. **14**. p. 438 (1902); Journ. of Exp. Medicine. Vol. **6**. p. 277 (1902). Ferner: The Constitution of Snake Venom and Snake Sera. Univ. of Pennsylvania Med. Bulletin. Vol. **15**. p. 345—362 (1902) and Vol. **16**. p. 163 (1903).

Über das **Schicksal der Schlangengifte im Organimus** ist wenig bekannt. Sie sollen zum Teil unverändert in den Harn übergehen und beim Menschen auch in den Sekreten mancher Drüsen in unveränderter und wirksamer Form ausgeschieden werden. Der Hauptausscheidungsweg des Giftes scheint aber nach den Untersuchungen von *Alt*[1]) der Magendarmkanal zu sein.

Die Versuche über die Wirkungen der Schlangengifte an Tieren erfordern selbstverständlich einen Vorrat dieses schwierig zu erlangenden Materials, dessen Gewinnung und Kostbarkeit, soweit dasselbe überhaupt käuflich zu erwerben ist, besonders der chemischen Untersuchung dieser Gifte, für welche das Material in großen Mengen erforderlich ist, fast unüberwindliche Schwierigkeiten bereiten. Die genauere, pharmakologische Erforschung der Wirkungsweise dieser Gifte ist aber abhängig von der vorhergehenden chemischen Untersuchung, deren Endziel das Zerlegen der unter dem Namen „Schlangengift" bekannten Gemenge in die einzelnen wirksamen Bestandteile und die chemische Charakterisierung der letzteren sein muß.

Mit Rücksicht auf die praktische Bedeutung dieser Kenntnisse und in Anbetracht des hohen wissenschaftlichen Interesses, welches die Lösung dieser Fragen beansprucht, mögen hier die Methoden für

die Gewinnung und das Sammeln der Schlangengifte

kurz besprochen werden.

1. Man faßt die Schlange mit der rechten Hand dicht hinter dem Kopfe am Halse und läßt dieselbe dann in ein in der linken Hand gehaltenes Uhrglas beißen. Hierbei fließt, ganz so, wie wenn das Tier freiwillig seine Beute ergreifen will, aus den Giftzähnen das Giftsekret auf das Uhrglas. Das ausgeflossene Gift soll nun, zwecks Konservierung desselben, getrocknet werden. Das Trocknen muß bei niederer Temperatur geschehen, am besten über konzentrierter Schwefelsäure oder Chlorcalcium im Vakuumexsikkator.

2. Eine zweite Methode zur Gewinnung des Giftsekretes besteht darin, daß man die in dem Käfig befindliche Schlange reizt und sie dann in einen mit einer dünnen Gummimembran überzogenen Glastrichter von angemessener Größe beißen läßt. Diese Methode bietet gegenüber der ersten den Vorteil, daß das Giftsekret reiner erhalten wird, weil es nicht mit den Sekreten der anderen, im Maul vorhandenen Drüsen verunreinigt wird; jedoch besteht bei diesem Verfahren die Gefahr des Abbrechens der Giftzähne, wenn die Schlange heftig beißt. Das an den inneren Wandungen des Trichters anhaftende oder, falls es sich um größere Mengen Giftes handelt, durch das Trichterrohr ablaufende Sekret wird dann wie unter 1. getrocknet.

---

[1]) *Alt,* Untersuchungen über die Ausscheidung des Schlangengiftes durch den Magen. Münchner med. Wochenschr. Nr. 4 (1892).

3. Läßt man die im Käfig befindliche Schlange anstatt wie unter 2. in einen Glastrichter, in einen Wattebausch oder ein Schwämmchen beißen, so vermeidet man dadurch die Gefahr des Abbrechens der Giftzähne; doch muß das Gift aus den genannten Objekten nachher mit Wasser extrahiert werden. Es ist daher das Eintrocknen einer größeren Flüssigkeitsmenge unvermeidlich und wird dadurch die Möglichkeit einer Zersetzung des wirksamen Bestandteiles oder der wirksamen Bestandteile des gewonnenen Sekretes erhöht.

Bekanntlich erschöpft die Schlange durch wiederholtes Beißen sehr bald ihren Giftvorrat. Es empfiehlt sich daher, zur Gewinnung eines möglichst stark wirksamen Sekretes, die Tiere nicht öfter als einmal pro Woche beißen zu lassen.

4. Verfügt man über eine beliebig große Anzahl von Giftschlangen, so kann man das Gift schließlich in der Weise sammeln, daß man die Tiere tötet, die Giftdrüsen herauspräpariert, diese mit einer Nadel ansticht und den Inhalt auspreßt und trocknet.

Eidechsen, Sauria.

Heloderma suspectum und H. horridum, die Krusteneidechse.

Der weit verbreiteten Anschauung gegenüber, daß die Schlangen die höchststehenden, spezifisch und aktiv giftigen Tiere sind, dürfte die Tatsache von besonderem Interesse sein, daß es auch unter den Eidechsen, die entwicklungsgeschichtlich den Schlangen nahe stehen, wenigstens eine Gattung gibt, die sicher zu den Gifttieren zu rechnen ist. Diese eigenartige Gattung ist mit dem Namen Heloderma belegt worden. Das Experiment hat die Giftigkeit des Tieres mit Sicherheit nachgewiesen.

Die Zähne, sowohl des Unter- als auch des Oberkiefers des Heloderma, sind gefurcht und unterscheiden sich dadurch von den Zähnen sämtlicher bisher beschriebenen Eidechsen, mit Ausnahme einer seltenen, von *Steindachner* beschriebenen, auf Borneo einheimischen Eidechse, Lanthanotus borneensis, deren Kieferzähne ebenfalls seicht gefurcht sind.

Während bei den übrigen Eidechsen die Speicheldrüsen nur schwach entwickelt sind, erreichen die Unterkieferdrüsen des Heloderma eine relativ enorme Größe und Ausbildung. Sie liegen unter dem Unterkiefer und münden an der Basis der gefurchten Zähne.

Um das Giftsekret zu sammeln, ließen *S. Weir Mitchell* und *Reichert* [1]) ein in Gefangenschaft befindliches Heloderma in den Rand einer Untertasse beißen. Das Tier hielt den Gegenstand lange Zeit sehr fest im Maule. Dabei träufelte ein klares Sekret, welches aufgefangen wurde, in kleinen Mengen aus dem Maule. Die Flüssigkeit verbreitete einen schwachen, nicht

[1]) Medical News. Vol. **42**. p. 209 (1883); Science. Vol. **1**. p. 372 (1883); American Naturalist. Vol. **17**. p. 800 (1883). Vgl. auch *S. Weir Mitchell*, Century Magazine. Vol. **38**. p. 503 (1889).

unangenehmen, aromatischen Geruch: die Reaktion derselben war deutlich alkalisch.

Mitchell und *Reichert* stellten ihre Versuche teils mit unverändertem, frischem (nativem), teils mit eingetrocknetem und in Wasser wieder aufgelöstem Sekret an Fröschen, Tauben und Kaninchen an.

Einer Taube wurden 0·24 *cm*³ Gift in die Brustmuskeln injiziert. Nach wenigen Minuten fing das Tier an zu wanken, die Respiration wurde zuerst beschleunigt, dann langsamer und nach sechs Minuten traten Krämpfe ein. In der siebenten Minute nach der Injektion starb das Tier. An der Injektionsstelle war eine lokale Wirkung des Giftes nicht zu erkennen.

Zwei Kaninchen, von welchen das eine vagotomiert war, erhielten je 10 *mg* des getrockneten Helodermagiftes in die Vena jugularis. Das vagotomierte Tier starb nach $1^1/_2$ Minuten, das nicht vagotomierte nach 19 Minuten; beide Tiere verendeten unter Konvulsionen.

Die Resultate von *Mitchell* und *Reichert* haben in bezug auf die Giftigkeit des Heloderma *Sumichrast* [1]), *Boulenger* [2]), *A. Dugès* [3]), *Garman* [4]) und *Bocourt* [5]) durch eigene Versuche an Tieren bestätigt.

Beim Menschen hat man nur starke Schmerzhaftigkeit und heftiges Anschwellen des betroffenen Gliedes oder Körperteiles nach Helodermabiß beobachtet.

Die Wirkungen des Giftsekretes von Heloderma suspectum Cope haben dann noch *C. G. Santesson* [6]), *J. van Denburgh* und *O. B. Wight* [7]) untersucht.

Nach *Santesson* wirkt die aus einem, von einem Heloderma angebissenen Schwämmchen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgelaugte Flüssigkeit, Fröschen, Mäusen oder Kaninchen subkutan beigebracht, immer tödlich. Die Wirkung besteht in einer sich schnell entwickelnden, wahrscheinlich zentralen Lähmung, die anfänglich den Charakter einer Narkose zeigt. Die Ursache der Lähmung ist nicht eine Folge der darniederliegenden Zirkulation: beim Frosch beobachtete *Santesson* totale Lähmung, während das Herz noch schlug. Die Wirkung des Giftes erstreckt sich jedoch nicht nur auf das Zentralnervensystem; früher oder später gesellt sich zu der zentralen Lähmung noch eine langsam sich entwickelnde Lähmung der motorischen Nervenendigungen, also eine curarinartige Wirkung.

---

[1]) *Sumichrast*, Note on the habits of some Mexican reptiles. Annals and Magazine of Natural History. Vol. **13**. Ser. 3. p. 497 (1864).

[3]) Proc. Zoolog. Soc. p. 631. London 1882.

[2]) Cinquantinaire de la Soc. de Biologie. Volume jubilaire publié par la Société. p. 134. Paris 1899.

[4]) Bulletin of the Essex Institute, Salem, Mass. Vol. 22. p. 60—69 (1890).

[5]) Compt. rend. de l'acad. des Sciences. T. **80**. p. 676 (1875).

[6]) *C. G. Santesson*, Über das Gift von Heloderma suspectum Cope, einer giftigen Eidechse. Nordiskt Medicinskt Archiv. Festband tillegnadt Axel Key. Nr. 5 (1896).

[7]) American Journal of Physiology. Vol. **4**. p. 209 (1900). — Zentralbl. f. Physiol. Bd. **14**. S. 399 (1900).

Bei der subkutanen Injektion des Giftes sah *Santesson* an Fröschen lokale Wirkungen des Giftes, bestehend in Schwellung, Ödem und Blutungen. Die Beobachtungen und Versuche, bei welchen Menschen und größere Tiere von Helodermen gebissen wurden, sprechen entschieden dafür, daß das Helodermagift, ähnlich wie das Gift mancher Schlangen, Lokalerscheinungen bewirkt.

Nach *J. van Denburgh* und *O. B. Wight* löst das Gift von Heloderma suspectum im Reagenzglas die roten Blutkörperchen[1] auf, macht das Blut ungerinnbar nach vorausgegangener Thrombenbildung und wirkt zuerst erregend, dann lähmend auf das Zentralnervensystem. Atembewegungen und Herzschlag werden erst beschleunigt, dann zum Stillstande gebracht, das Herz auch durch lokale Giftwirkung gelähmt. Speichelfluß, Erbrechen, Abgang von Kot und Harn charakterisieren die ersten Stadien der Vergiftung; der Tod tritt nach diesen Autoren entweder infolge von Atemstillstand oder durch Thrombenbildung oder Herzlähmung ein.

Über die chemische Natur und Zusammensetzung des wirksamen Bestandteils des Helodermagiftes wissen wir nur, daß der Giftkörper Kochen in schwach essigsaurer Lösung ohne Abnahme der Wirksamkeit verträgt und deshalb nicht zu den Fermenten gezählt werden kann. *Santesson* glaubt sich auf Grund einer orientierenden chemischen Untersuchung zu der Annahme berechtigt, daß toxisch wirkende Alkaloide in dem Giftsekrete wahrscheinlich nicht vorhanden sind, und daß die hauptsächlichen giftigen Bestandteile des Helodermaspeichels ihrer chemischen Natur nach teils zu den nukleinhaltigen Substanzen, teils zu den Albumosen gehören.

Die Wirkungen des Giftsekretes scheinen sich qualitativ den Wirkungen der Schlangengiftsekrete zu nähern.

Amphibien, Lurche, Amphibia.

Die Hautdrüsensekrete einer Anzahl von nackten Amphibien enthalten giftige Substanzen.

1. Ordnung: Anura, schwanzlose Amphibien.

Gattung Bufo.

Bufo vulgaris Lin., die gemeine Kröte, wird bereits von *Nikander* als giftig bezeichnet.

Die Angaben der älteren Autoren über die Giftigkeit der Kröten sind sehr widersprechender Natur, was darauf zurückzuführen ist, daß diese keine Tierversuche ausführten, oder, falls letzteres geschah, sie nicht mit dem Hautdrüsensekret, sondern vielmehr mit dem Harn oder dem Darminhalt dieser Tiere ihre Versuche anstellten.

[1]) Vgl. hierzu *E. Cooke* and *Leo Loeb*, Haemolytic action of the Venom of Heloderma suspectum. Proc. of the Soc. f. exp. Biology and Medicine. Vol. 5. p. 104 (1908).

Die Giftigkeit des Hautdrüsensekretes der Kröte wurde an verschiedenen Tieren sicher und einwandfrei durch *Gratiolet* und *Cloëz* (1851) und dann durch die Untersuchungen von *Vulpian*[1]) (1854) festgestellt.

Calmels[2]) beschäftigte sich im Jahre 1884 mit der chemischen Natur des Krötenhautdrüsensekretes und gab an, darin Methylkarbylamin[2]) und Isocyanessigsäure gefunden zu haben. Ersteres soll dem Sekrete, wenigstens zum Teil, seinen charakteristischen Geruch verleihen und die Giftwirkung bedingen. Auch beim Wassersalamander oder Kammmolch will *Calmels* eine Isocyanverbindung im Hautsekret gefunden haben, und zwar in diesem Falle die α-Isocyanpropionsäure.

Phisalix und *Bertrand* haben 1893 das Blut von Bufo vulgaris auf giftige Bestandteile untersucht und fanden, daß der von den Hautdrüsen dieser Tiere sezernierte giftige Körper sich auch in ihrem Blute nachweisen läßt, jedoch in weit geringerer Menge darin vorhanden ist. Die Gegenwart des wirksamen Körpers im Blute wurde durch Tierversuche nachgewiesen.

Die Ursachen der Widerstandsfähigkeit der Kröte gegen die Stoffe der Digitalingruppe und andere Gifte hat *O. Heuser*[3]) studiert.

In dem Sekret der Bauch- und Rückenhaut der Feuerkröte, Bombinator igneus, und der gemeinen Kröte, Bufo vulgaris s. cinereus wies *Fr. Pröscher*[4]) ein von ihm Phrynolysin genanntes, hämolytisch wirkendes Gift nach, welches aber nicht isoliert und chemisch untersucht wurde. Das Phrynolysin spielt bei dem Zustandekommen der charakteristischen Herzwirkung des Krötengiftes keine Rolle.

* * *

Bei der chemischen Untersuchung des Krötenhautdrüsensekretes gelang es *Faust*, den von ihm **Bufotalin** genannten, digitalinartig wirkenden Bestandteil und einen diesem chemisch nahestehenden, ähnlich, aber viel schwächer wirkenden Körper, das **Bufonin**, zu isolieren und rein darzustellen. Fast gleichzeitig veröffentlichten *Phisalix* und *Bertrand*[5]) ihre Untersuchungen über denselben Gegenstand. Diese Autoren beschreiben die Wirkungen eines nicht isolierten und chemisch nicht charakterisierten Körpers, den sie „Bufoténine" nennen. Von dem Vorhandensein dieses Stoffes im Hautsekrete der Kröten hat sich Verfasser bisher weder auf chemischem noch auf pharmakologischem Wege überzeugen können.[6])

---

[1]) Ausführliches Literaturverzeichnis bis 1902 bei *E. St. Faust*, Über Bufonin und Bufotalin, die wirksamen Bestandteile des Krötenhautdrüsensekretes. Archiv f. exper. Path. u. Pharmak. Bd. **47**. S. 278 (1902).

[2]) Sur le venin des Batraciens. Compt. rend. de l'acad. des Sciences. T. **98**. p. 436 (1884).

[3]) *O. Heuser*, Über die Giftfestigkeit der Kröten. Arch. inter. de Pharmacodynamie etc. T. **10**. p. 483 (1902).

[4]) *Fr. Pröscher*, Zur Kenntnis des Krötengiftes. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **1**. S. 575 (1902).

[5]) Compt. rend. T. **135** (**1**). p. 46—48 (1902).

[6]) Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. Bd. **49**. S. 1 (1902).

Das Bufonin kristallisiert aus den alkoholischen Auszügen der Krötenhäute beim Einengen der ersteren in feinen Nadeln oder derberen Prismen, die nach wiederholtem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 152° zeigen und bei der Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung nach *Raoult-Beckmann* für die Formel $C_{34}H_{54}O_2$ gut stimmende Werte gaben.

Das Bufonin ist leicht löslich in Chloroform, Benzol und heißem Alkohol, schwerer löslich in Äther, sehr wenig löslich in kaltem Alkohol und Wasser. Es ist eine neutrale Verbindung, unlöslich in Säuren und in Alkalien.

Nachweis des Bufonins auf chemischem Wege.

Löst man ein wenig des Bufonins in Chloroform und schichtet darunter konzentrierte Schwefelsäure, so entsteht zunächst an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeiten eine dunkelrot gefärbte Zone, die an Ausdehnung allmählich zunimmt. Mischt man die beiden Flüssigkeiten, so färbt sich das Chloroform zuerst hell-, dann dunkelrot, schließlich purpurfarbig. Die Schwefelsäure zeigt eine grünliche Fluoreszenz.

In Essigsäureanhydrid gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure gemischt, zeigt das Bufonin ein ähnliches Farbenspiel wie das Cholesterin, mit dem Unterschiede, daß das Auftreten der rosa und roten Färbung des Gemisches von Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure sehr vorübergehend ist, manchmal sogar ausbleibt. Die schließliche Farbe des Gemisches ist hier dunkelgrün.

* * *

Das **Bufotalin** geht bei der Behandlung der Rückstände alkoholischer Auszüge von Krötenhäuten mit Wasser in letzteres über und kann nach vorhergehender Reinigung solcher Lösungen mit Bleiessig, Entfernung des überschüssigen Bleies mittelst Schwefelsäure usw. aus diesen durch Kaliumquecksilberjodid gefällt werden. Aus diesen Fällungen wird es dann in der üblichen Weise mit Silberoxyd freigemacht und hierauf mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus seiner Lösung in Chloroform wird das Bufotalin durch Petroläther gefällt. Durch fraktionierte Fällungen mit Petroläther erhält man amorphe, aber in ihrer Zusammensetzung konstante Analysenpräparate, welche auf die Formel $C_{34}H_{46}O_{10}$ sehr genau stimmende Werte geben.

Das Bufotalin ist leicht löslich in Chloroform, Alkohol, Eisessig und Azeton, unlöslich in Petroläther, ziemlich schwer löslich in Benzol und in Wasser. Eine gesättigte wässerige Lösung desselben enthält im Kubikzentimeter 0·0026 *g*. Die Löslichkeit des Bufotalins in Wasser ist also etwa $2^1/_2$ pro Mille. Seine wässerige Lösung reagiert sauer.

In wässerigen Alkalien, Natronlauge, Kalilauge, Natriumkarbonat und Ammoniak ist das Bufotalin leicht löslich. Seiner sauren Natur gemäß verbindet es sich mit den oben genannten Basen zu Salzen. Die wässerigen

Lösungen der Alkalisalze reagieren alkalisch, zeigen eine schwache Opaleszenz und schmecken stark bitter.

Das Bufotalin scheint keine Hydroxylgruppen im Molekül zu enthalten, wie das bei dem Bufonin der Fall ist. Versuche, durch Azylierung zu einem kristallinischen Derivat zu gelangen, führten nicht zum Ziele. Als das Bufotalin nach der Methode von *Liebermann* und *Hörmann*[1]) mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat längere Zeit am Rückflußkühler erhitzt wurde, konnte dasselbe fast quantitativ unverändert zurückgewonnen werden. Beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure während fünf Minuten erlitt das Bufotalin keine Veränderung. Auch trat bei dieser Behandlung keine Farbenreaktion ein. Die nach dem Kochen mit Salzsäure alkalisch gemachte Flüssigkeit reduzierte Kupferoxyd nicht.

Von den Fällungsreagentien für das Bufotalin ist noch das Tannin zu erwähnen. Aus seiner wässerigen Lösung fällt Tannin das Bufotalin in groben Flocken. Es gelingt jedoch nicht, das letztere aus seiner Tanninverbindung nach der gewöhnlichen Methode mittelst Zinkoxyd oder Bleioxyd zu isolieren, weil das Bufotalin mit den genannten Metallen schwer lösliche oder unlösliche Verbindungen bildet.

Nachweis des Bufotalins auf Grund seiner pharmakologischen Wirkungen.

Die Wirkung des reinen, der Zusammensetzung $C_{34}H_{46}O_{10}$ entsprechenden Körpers deckt sich im wesentlichen mit derjenigen, welche frühere Experimentatoren für das ganze Sekret beschrieben haben, d. h. das Bufotalin entfaltet seine Wirkung, abgesehen von einer lokalen Reizung, ausschließlich auf das Herz, und diese Wirkung stimmt mit der Digitalinwirkung dem Charakter nach in allen Punkten überein.

Dementsprechend vermindert es die Zahl der Pulse, bewirkt eine Verstärkung der Systolen, welcher dann die unter dem Namen „Herzperistaltik" bekannten Unregelmäßigkeiten der Herzkontraktionen folgen, und führt schließlich beim Frosche zu **systolischem Stillstand** des Herzens. Der ganze Verlauf dieser Erscheinungen am Herzen ist genau wie nach einem der Stoffe der Digitalingruppe, namentlich schlagen die Vorhöfe noch kurze Zeit nach eingetretenem Ventrikelstillstand fort, indem sie sich dabei prall mit Blut füllen, bis auch sie zum Stillstand kommen.

Rana esculenta reagiert auf Bufotalin, wie das für diese Froschart von *Schmiedeberg* für das Digitalin festgestellt worden ist, in etwas anderer Weise. Ebenso wie beim Digitalin kommt auch beim Bufotalin der systolische Herzstillstand am Esculentaherz nicht so ausgesprochen zustande wie bei Rana temporaria. Entweder steht der Ventrikel überhaupt nicht vollständig in Systole still oder der systolische Stillstand erfolgt erst nach bedeutend größeren Gaben.

[1]) *C. Liebermann* und *O. Hörmann*, Über die Formeln des Rhamnetins und Xanthorhamnins. Ber. d. Deutschen chem. Ges. Jahrg. **11**. S. 1619 (1878).

Schon 0·04 bis 0·05 *mg* Bufotalin, in 50 cm^3 Nährflüssigkeit gelöst, bewirken am isolierten Froschherzen eine bedeutende Zunahme des Pulsvolumens und eine Abnahme der Pulsfrequenz.

Das Bufotalin hat keine Wirkung auf das Nervensystem. Eine Wirkung auf die Skelettmuskeln ist ebenfalls nicht nachzuweisen. An einem in physiologischer Kochsalzlösung befindlichen Zupfpräparat vom Froschmuskel sieht man unter dem Mikroskop auf Zusatz von Bufotalinlösung keinerlei Veränderung der Muskelfasern eintreten.

Nach der subkutanen Injektion von 5·2 *mg* traten bei einem Kaninchen von 2050 *g* Körpergewicht die Vergiftungserscheinungen nach 40 Minuten und der Tod nach einer Stunde ein.

Bei einem Versuch an einer Katze von 2·3 *kg* Körpergewicht erfolgte der Tod nach subkutaner Injektion von 2·6 *mg* Bufotalin unter Konvulsionen in vier Stunden. Erbrechen machte den Beginn der Vergiftung bemerkbar. Dasselbe dauerte während des ganzen Versuches fort.

Die letale Dosis des Bufotalins für das Säugetier ist bei subkutaner Applikation annähernd 0·5 *mg* pro Kilogramm Körpergewicht. Bei Fröschen tritt der systolische Herzstillstand nach Einverleibung von 0·5 *mg* innerhalb 10 Minuten ein, doch genügt schon die Hälfte dieser Menge, um an dem Herzen in situ die Veränderungen im Rhythmus und im Pulsvolumen deutlich hervortreten zu lassen. Nach 20 Minuten habe ich auch nach 0·25 *mg* systolischen Herzstillstand eintreten sehen.

* * *

Das Bufonin hat qualitativ die gleiche Wirkung wie des Bufotalin. Die Wirkung ist aber eine sehr schwache.

Das Bufotalin bildet, seiner chemischen Natur nach, eine Ausnahme unter den Stoffen der Digitalingruppe: während letztere, abgesehen vom Erythrophlein, neutrale, stickstofffreie Verbindungen sind, ist das Bufotalin eine Säure.

Ob der von *Capparelli* (vgl. S. 857) im Hautsekrete von Triton cristatus aufgefundene Körper, welcher ebenfalls saure Eigenschaften zeigte und an Fröschen systolischen Herzstillstand hervorrief, mit dem Bufotalin identisch ist, muß vorläufig noch dahingestellt bleiben.

Über die Beziehungen des Bufonins und des Bufotalins zueinander und zum Cholesterin.

Ein Vergleich der beiden für das Bufonin und das Bufotalin oben aufgestellten Formeln läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß es sich beim letzteren um ein Oxydationsprodukt des ersteren handelt. Es ist mir durch Oxydation mittelst Kaliumbichromat in schwefelsaurer Lösung gelungen, aus dem Bufonin einen Körper zu erhalten, der, wenigstens in bezug auf die Wirkung, mit dem Bufotalin übereinstimmte.

Versuche, das Bufotalin durch Reduktion in das Bufonin überzuführen, blieben erfolglos. Die verschiedensten Reduktionsmittel lieferten

unter verschiedenen Versuchsbedingungen entweder unansehnliche Produkte, aus denen keine wohlcharakterisierten Verbindungen isoliert werden konnten, oder sie ließen das Bufotalin zum größten Teil unverändert.

Die oben (S. 848) beschriebenen Farbenreaktionen ließen an die Möglichkeit denken, daß das Bufonin vielleicht dem Cholesterin chemisch nahe verwandt ist. Auch mußte die einfache, aus den Analysenzahlen zunächst berechnete, halbierte Formel in dieser Hinsicht auffallen, insbesondere wenn man anstatt $C_{17} H_{27} O = C_{17} H_{26} . OH$ schreibt. Daß es sich um ein verdoppeltes Molekül eines Cholesterinhomologons handelt, lehrt folgendes Versuchsergebnis.

Bufonin wurde mit Phosphorpentachlorid in einer kleinen Porzellanreibschale innig vermischt. Es bildete sich ein Chlorid des Bufonins, welches aus Alkohol in wohlausgebildeten federartig gruppierten Nadeln kristallisierte. Die Verbindung zeigte nach wiederholtem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 103°. Analyse: Gefunden Cl = 13·16%.

Berechnet für $C_{34} H_{52} Cl_2$: Cl = 13·37%.

Das Molekulargewicht dieser Chlorverbindung (531), die Bufonylchlorid heißen mag, bestimmte ich zu 522 und 534, im Mittel also 528, woraus hervorgeht, daß es sich weder um Cholesterylchlorid (Molekulargewicht 404·5), noch um ein der halbierten Formel $C_{17} H_{26}$—OH entsprechendes Chlorderivat (Molekulargewicht 265·5) handeln kann.

Es gelingt nach der von *Mauthner* und *Suida*[1]) beim Cholesterylchlorid eingeschlagenen Methode, das Chlor der Chlorverbindung des Bufonins durch Wasserstoff zu ersetzen und so zu einem ungesättigten Kohlenwasserstoff zu gelangen. Ich habe indessen den dem Bufonin entsprechenden Kohlenwasserstoff nicht isoliert, sondern nur festgestellt, daß der durch Einwirkung von Natrium in äthylalkoholischer Lösung auf das oben beschriebene Chlorderivat entstehende Körper Brom ohne Bromwasserstoffentwicklung zu binden vermag, wenn man eine Chloroformlösung desselben mit Brom versetzt.

Das Bufonin ist keine esterartige Verbindung des Cholesterins, wie solche von *Hürthle*[2]) aus Blutserum dargestellt worden sind. Nach längerem Kochen mit alkoholischem Natriumhydroxyd konnte ich das Bufonin fast quantitativ unverändert zurückgewinnen.

Aus diesen Resultaten ergibt sich, daß das Bufonin ein cholesterinähnlicher Körper ist, zusammengesetzt aus zwei Atomgruppen $C_{17} H_{26} . OH$, welche durch Kohlenstoffatome verbunden sind, so daß die beiden Hydroxylgruppen frei und durch Chlor ersetzbar bleiben:

$$HO . H_{26} C_{17} — C_{17} H_{26} . OH.$$

Die Ergebnisse dieser Versuche mußten die Vorstellung erwecken, daß vielleicht auch gewisse Derivate des Cholesterins ähnliche Wirkungen wie die des Bufonins und Bufotalins zeigen würden.

[1]) *Mauthner* und *Suida*, Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. Monatshefte f. Chemie. Bd. 15. S. 87 (1895).

[2]) *Hürthle*, Über die Fettsäurecholesterinester des Blutserums. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 21. S. 331 (1895/96).

In dieser Richtung von mir unternommene Versuche haben ergeben, daß in der Tat gewissen Derivaten des menschlichen, aus Gallensteinen gewonnenen Cholesterins eine eigenartige Herzwirkung neben anderen Wirkungen zukommt.

Auch verschiedene von *A. Windaus*[1]) dargestellte und mir zur pharmakologischen Prüfung überlassene saure Oxydationsprodukte des menschlichen Cholesterins zeigten dieselbe Wirkung auf das Froschherz wie die von mir dargestellten Präparate, bewirkten aber an Fröschen bei der subkutanen Injektion ihrer Natriumsalze tiefgreifende lokale Veränderungen (Gewebsnekrose) an der Injektionsstelle und ihrer Umgebung.

2. Ordnung: Urodela, geschwänzte Amphibien. Gattung Salamandra.

Salamandra maculosa Laur., der gewöhnliche Feuersalamander, bereitet in gewissen Hautdrüsen der Nacken-, Rücken- und Schwanzwurzelgegend ein rahmartiges, dickflüssiges Sekret, welches zwei pharmakologisch sehr wirksame Stoffe enthält. Der Salamander gehört zu den „passiv" giftigen Tieren: er vermag das Sekret der Hautdrüsen nicht willkürlich auszuspritzen.

Die **chemische Untersuchung des Hautsekretes** von Salamandra maculosa unternahm zuerst *Zalesky*[2]), der auch in seiner Arbeit die früheren Publikationen zusammengestellt hat. Er isolierte aus dem Sekret eine organische Base, deren Wirkung sich mit derjenigen des ganzen Sekretes deckte und nannte dieselbe Samandarin.

Im Jahre 1899 gelang es *E. St. Faust*, bei der Verarbeitung eines großen Materials (1600 Feuersalamander) zwei wirksame Basen in Form kristallinischer Sulfate darzustellen, indem aus den mit Chloroform getöteten und dann zerkleinerten Tieren durch Extraktion des Salamanderbreies mit schwach essigsaurem Wasser bei Siedehitze, Fällung des Auszuges mit Bleiessig, Entfernung des überschüssigen Bleies aus dem Filtrat durch Schwefelsäure, Fällung der Basen mit Phosphorwolframsäure, Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages mittelst Barythydrat und Entfernung der noch vorhandenen, die Biuretreaktion gebenden Substanzen durch ein besonderes Verfahren[3]) Lösungen der beiden Basen erhalten wurden.

Die Entfernung der letzten Spuren biuretgebender Substanzen wurde in der Weise erreicht, daß die die Biuretreaktion gebenden Lösungen des Samandarins in einem Mörser mit feingepulvertem **Ätzbaryt** verrieben werden. Man setzt so lange Baryt zu, bis die Masse

---

[1]) Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. **36**. S. 3752 (1903); Jg. **37**. S. 2027. 3699. 4753 (1904).

[2]) *Hoppe-Seylers* med.-chem. Untersuchungen. Heft 1. S. 85. Berlin 1866.

[3]) *E. St. Faust*, Beiträge zur Kenntnis des Samandarins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **41**. S. 229 (1898) und Beiträge zur Kenntnis der Salamanderalkaloide. Ebenda. Bd. **43**. S. 84 (1899).

eine teigartige, steife Konsistenz annimmt und extrahiert dann die Masse mit Alkohol von 96%. Dabei geht das Samandarin in Lösung, während die Biuretreaktion gebenden Stoffe, wahrscheinlich in Form von Baryumverbindungen, ungelöst zurückbleiben. Überschüssiges, in den Alkohol übergehendes Baryumhydroxyd wird durch Kohlensäure und eventuell durch Schwefelsäure entfernt.

Diese biuretfreien Samandarinlösungen wurden mit Schwefelsäure angesäuert und nochmals mit chemisch reiner Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag auf dem Filter gesammelt, gut ausgewaschen, dann mit chemisch reinem Ätzbaryt in der üblichen Weise zerlegt, die Flüssigkeit abfiltriert und aus dem Filtrat das Baryum mittelst Kohlen- und Schwefelsäure genau ausgefällt. Neutralisiert man die in dieser Weise erhaltene wässerige, alkalisch reagierende Lösung des Samandarins genau mit Schwefelsäure und dampft bei mäßiger Wärme bis zur Trockne ein, so hinterbleibt ein schwach gelblich gefärbter, amorpher Rückstand, der in Alkohol löslich ist. Als die alkoholische Lösung mit Äther bis zur eben bleibenden Trübung der Flüssigkeit versetzt wurde, schieden sich nach einigen Tagen bei niederer Temperatur sehr feine, mikroskopische Kristallnädelchen des Sulfats der Base aus, welche meist zu Büscheln oder auch zu sternartigen Aggregaten vereinigt waren. Der kristallinische Niederschlag wurde auf einem kleinen gehärteten Filter gesammelt, mit einem Gemisch von Alkoholäther (in denselben Mengenverhältnissen wie in der Mutterlauge) gewaschen, dann getrocknet und aus Wasser, in welchem das Sulfat schwer löslich ist, umkristallisiert.

Läßt man eine nicht zu konzentrierte, durch Erwärmen hergestellte Lösung von Samandarinsulfat langsam erkalten, so scheidet sich das Salz in feinen, bis zu $1^1/_2$ *cm* langen, schönen Nadeln aus. Diese Kristalle enthalten Kristallwasser und verwittern an der Luft, wenn man sie aus der Mutterlauge entfernt. Gewöhnlich kristallisiert das Samandarinsulfat jedoch in kleinen, mit dem bloßen Auge immerhin deutlich erkennbaren Kristallnadeln, die sich meistens büschel- oder sternförmig gruppieren und kristallwasserfrei sind.

Aus den bei den Elementaranalysen und den Schwefelsäurebestimmungen gewonnenen analytischen Daten berechnet sich für das Samandarinsulfat die Formel $(\mathbf{C}_{26}\,\mathbf{H}_{40}\,\mathbf{N}_2\mathbf{O})_2 + \mathbf{H}_2\,\mathbf{SO}_4$.

Auf Zusatz von Platinchlorid zur salzsauren, wässerigen Lösung des Samandarins fällt bei genügender Konzentration das Platindoppelsalz als voluminöser, hellbrauner Niederschlag aus, welcher bei dem Versuch, ihn durch Erwärmen zu lösen und umzukristallisieren, sich zersetzt. Das reine, kristallisierte Samandarinsulfat wurde deshalb in das Hydrochlorat umgewandelt und dieses mit Platinchlorid gefällt, der amorphe Niederschlag abfiltriert, mit Salzsäure gewaschen und dann im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Beim Trocknen verlor die Verbindung Salzsäure, so daß an Stelle der zu erwartenden Verbindung $(C_{26}\,H_{40}\,N_2\,O\,.\,HCl)_2\,.\,PtCl_4$ die Verbindung $(C_{26}\,H_{40}\,N_2\,O)_2\,.\,PtCl_4$ vorlag. Ähnliche Verbindungen von

bekannteren Alkaloiden liegen ja auch vor im Pilokarpinchloraurat und im Ecgoninchloroplatinat.

Versetzt man die wässerige Lösung des Samandarinsulfats mit Soda oder Natronlauge, so fällt die freie Base als schwach gelblich gefärbtes Öl aus. Selbst nach zweiwöchentlichem Stehen im Eisschrank erstarrte dasselbe nicht.

Das Samandarinsulfat ist optisch aktiv. Es dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. 1·0886 *g* Substanz, gelöst in 20·94 *g* Wasser, gaben im 200 *mm*-Rohr eine Ablenkung von — 5·36° als Mittel der beobachteten Drehung in den vier Quadranten. Das spezifische Gewicht der Lösung bestimmte ich zu 1·01. Aus diesen Daten berechnet sich die spezifische Drehung des Samandarinsulfats $\alpha_D = -53{\cdot}69^{\circ}$.

Übergießt man eine geringe Menge der Samandarinsulfatkristalle im Reagenzglase mit konzentrierter Salzsäure und erhält die Flüssigkeit einige Minuten im Sieden, so färbt sich dieselbe zunächst violett, um dann bei längerem Erhitzen eine **tiefblaue Farbe** anzunehmen. Zum Zustandekommen dieser Blaufärbung scheint jedoch Luftzutritt erforderlich zu sein. Es ist dies eine sehr **charakteristische Reaktion** des Samandarins.

Eine so ausgesprochene Farbenreaktion mit konzentrierter Salzsäure erhält man bei den bekannteren Alkaloiden nur mit dem Veratrin, welches unter diesen Bedingungen eine kirschrote Flüssigkeit gibt.

Beim Kochen des Samandarins mit konzentrierter Salzsäure spaltet sich ein ölartiger Körper ab, über dessen Natur vorläufig bestimmte Angaben nicht gemacht werden können.

Nachweis des Samandarins auf pharmakologischem Wege.

Die Wirkungen des Samandarins betreffen das Zentralnervensystem und äußern sich zunächst in Steigerung der Reflexerregbarkeit, welche später vermindert ist und zuletzt gänzlich verschwindet. Das Samandarin wirkt zuerst erregend, dann lähmend auf die in der Medulla gelegenen automatischen Zentren, insbesondere auch auf das Respirationszentrum.

Die Folgen der Erregung des Zentralnervensystems sind zu erkennen in den heftigen Konvulsionen, die namentlich an Fröschen schließlich mit Tetanus gepaart sein können. Die Erregung der in der Medulla gelegenen Zentren zeigt sich in beschleunigter Respiration, Erhöhung des Blutdruckes und Abnahme der Pulsfrequenz.

Die Todesursache ist beim Warmblüter in der Lähmung des Respirationszentrums zu erblicken.

Die genannten Wirkungen des Samandarins begründen dessen Einreihung in dem natürlichen pharmakologischen System in die Gruppe der sogenannten Krampfgifte, zu welcher das Pikrotoxin, das Coriamyrtin, das Digitaliresin und das Toxiresin gehören. Jedoch unterscheidet es sich von diesen dadurch, daß die Konvulsionen mit tetanischen Krämpfen untermischt sind.

Die Dosis letalis des reinen Samandarins beträgt für den Hund bei subkutaner Applikation 0·0007 bis 0·0009 *g* pro Kilogramm Körpergewicht.

Kaninchen erwiesen sich im Vergleich zum Körpergewicht relativ noch empfindlicher gegen das Gift.

Samandaridin.

Außer dem Samandarin findet sich im Organismus des Feuersalamanders noch ein zweites Alkaloid, welches seiner Zusammensetzung sowohl als auch seiner pharmakologischen Wirkung nach zum Samandarin in naher Beziehung steht. Ich erhielt dieses Alkaloid, für welches ich den Namen **Samandaridin** vorgeschlagen habe, in Form seines sehr schwer löslichen schwefelsauren Salzes, als ich, nach der Fällung mit Phosphorwolframsäure und der Zersetzung des Phosphorwolframsäureniederschlages mittelst Barythydrat, die mit Schwefelsäure neutralisierte, vom Bariumsulfat abfiltrierte Flüssigkeit stark einengte. Es schied sich das Samandaridinsulfat aus der heißen, noch die Biuretreaktion gebenden, neutralen Lösung kristallinisch aus. Ich habe diesen Körper dann aus viel heißem Wasser umkristallisiert und nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz der Elementaranalyse unterworfen, wobei auf die Formel $(C_{20}H_{31}NO)_2 + H_2SO_4$ gut stimmende Werte erhalten wurden.

Setzt man zu der wässerigen Lösung des Chlorhydrats dieses Alkaloids Goldchlorid hinzu, so fällt die Goldverbindung der Base kristallinisch aus. Die Analyse dieses Golddoppelsalzes bestätigt die für das Alkaloid oben aufgestellte Formel.

Das Samandaridin scheint im Organismus des Feuersalamanders in bedeutend größerer Menge enthalten zu sein als das Samandarin. Wenigstens habe ich aus 800 Stück dieser Tiere fast 4 *g* dieses Alkaloids in Form des schwefelsauren Salzes erhalten, während die Ausbeute an reinem kristallisierten Samandarinsulfat nur etwa 1·8 *g* betrug.

Die Wirkungen des Samandaridins unterscheiden sich von denjenigen des Samandarins nur in quantitativer Beziehung; es sind etwa die sieben- bis achtfachen Mengen des ersteren erforderlich, um die gleiche Wirkung hervorzurufen. Qualitativ ist die Wirkung die gleiche. Hier wie dort stellen sich allgemeine Konvulsionen ein.

Das Samandaridinsulfat kristallisiert in mikroskopischen, rhombischen Plättchen oder Täfelchen. Es unterscheidet sich demnach vom Samandarinsulfat sowohl durch seine Kristallform als auch durch seine Schwerlöslichkeit in Wasser. Auch in Alkohol ist es schwer löslich. Das Samandaridin ist optisch inaktiv.

Beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure verhält sich dieser Körper wie das Samandarin; bei längerem Kochen wird die Flüssigkeit tief blau.

Bei der trockenen Destillation mit Zinkstaub liefert das Samandaridin ein stark alkalisch reagierendes Destillat, dessen Geruch Pyridin oder Chinolin vermuten läßt. Bei der Behandlung des Destillats mit salzsäurehaltigem Wasser ging der größte Teil desselben leicht in Lösung. Die saure Lösung

wurde mit Äther ausgeschüttelt, der Äther abgegossen und der wässerige Rückstand mit Tierkohle behandelt. Nach dem Abfiltrieren von der Kohle wurde dem noch heißen sauren Filtrat Platinchlorid zugesetzt. Beim Erkalten der Flüssigkeit schieden sich feine, dunkelgelbe, nadelförmige Kristalle aus, welche nach dem Umkristallisieren aus Wasser den Schmelzpunkt 261° zeigten: 0·1622 *g* dieser Substanz hinterließen beim Glühen 0·0444 *g* Pt = 27·36%.

Der Schmelzpunkt und der Platingehalt des Doppelsalzes dieses Zersetzungsproduktes des Samandaridins charakterisieren dasselbe als **Isochinolin.** Für das Chloroplatinat des Isochinolins finden sich angegeben der Schmelzpunkt 263° und die Zusammensetzung $(C_9H_7N.HCl)_2.PtCl_4 + 2H_2O$. Diese Formel verlangt einen Platingehalt von 27·59%. Gefunden Pt = 27·36%.

Hiermit ist der Beweis erbracht, daß das Samandaridin ein Derivat eines hexazyklischen, Stickstoff im Kern enthaltenden Kohlenwasserstoffs ist.

Unter den flüchtigen Zersetzungsprodukten des Samandaridins ließ sich durch die bekannte Fichtenspanreaktion die Anwesenheit von **Pyrrol** konstatieren.

Beziehungen des Samandarins zum Samandaridin.

Wenn man von der einen Formel die andere subtrahiert, so ergibt sich eine Differenz von C_6H_9N. Man darf wohl vermuten, daß es sich hier um eine Methylpyridingruppe — $C_5H_4(CH_3)N$ — handelt, die das Samandarin mehr besitzt als das Samandaridin.

Ob im Organismus das eine Alkaloid aus dem anderen entsteht, z. B. das Samandarin aus dem Samandaridin durch Synthese, das letztere aus jenem durch Spaltung, läßt sich zurzeit nicht entscheiden. Es ist nicht unwahrscheinlich, da so der aromatische Kern der Eiweißstoffe die Muttersubstanz für beide bilden könnte.

Bisher nahm man an, daß nur im Pflanzenorganismus den Chinolinderivaten angehörende, giftige Alkaloide gebildet werden. Durch die Reindarstellung des Samandarins und des Samandaridins und ihre Charakterisierung als Isochinolinabkömmlinge ist diese Fähigkeit auch für den tierischen Organismus dargetan. Die Muttersubstanzen für solche Produkte stammen allerdings in letzter Linie aus dem Pflanzenreich.

* * *

Bei der Untersuchung des Giftes von Salamandra atra Laur. (Alpensalamander) fand *Netolitzky*[1]) eine von ihm „Samandatrin" genannte, in Form ihres schwefelsauren Salzes gut kristallisierende, in Wasser schwer lösliche Base, deren Zusammensetzung vielleicht der Formel $C_{21}H_{37}N_2O_3$ entspricht und welche sich von dem Samandarin und dem Samandaridin des Feuersalamanders hauptsächlich durch ihre Löslichkeit in Äther unterscheiden soll.

Die Wirkungen des „Samandatrins" stimmen mit denjenigen der Alkaloide von Salamandra maculosa überein.

[1]) *F. Netolitzky,* Untersuchungen über den giftigen Bestandteil des Alpensalamanders. Archiv f. exper. Path. u. Pharmak. Bd. **51**. S. 118 (1904).

Gattung Triton.

Triton cristatus Laur., der gewöhnliche Wassersalamander, Wassermolch oder Kammmolch, sondert in gewissen Hautdrüsen ebenfalls ein rahmartiges, dickflüssiges Sekret ab, welches nach den Untersuchungen von *Vulpian*[1]) und von *Capparelli*[2]) giftige Stoffe enthält. Das Sekret reagiert in frischem Zustande sauer. Von 300 Tritonen konnte *Capparelli* 40 *g* des Sekretes gewinnen. Dieser Forscher untersuchte das Sekret nach der *Stas-Otto*schen Methode und fand: 1. daß der wirksame Bestandteil nur aus saurer Lösung in Äther überging, 2. daß derselbe stickstofffrei ist und 3. daß außerdem ein bei gewöhnlicher Temperatur flüchtiger, Lackmuspapier rötender Stoff mit dem Äther überging.

Über die chemische Natur des wirksamen Bestandteiles ist nichts näheres bekannt.

Nachweis des Tritonengiftes auf pharmakologischem Wege.

Die Wirkungen des Tritonengiftes untersuchte *Capparelli* an Fröschen, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden. Warmblüter starben infolge von Zirkulations- und Respirationsstörungen schneller als Frösche.

Die Wirkung auf das Froschherz äußerte sich in Abnahme der Pulsfrequenz, Herzperistaltik und systolischem Stillstand des Herzens. Beim Warmblüter erfolgt Steigerung des Blutdruckes mit nachfolgender Herzlähmung.

Auf die roten Blutkörperchen wirkt das Tritonengift hämolytisch und bietet hierin (vgl. Phrynolysin S. 847) eine weitere Ähnlichkeit mit den Wirkungen des Krötengiftes, mit welchem es auch in den Wirkungen auf die Zirkulation übereinstimmt. Vielleicht ist der für die letztgenannten Wirkungen verantwortliche Körper identisch oder chemisch nahe verwandt mit dem Bufotalin.

Fische, Pisces.

Den Arbeiten von *Byerley*[3]), *Günther*[4]), *Gressin*[5]) und *Bottard*[6]) verdanken wir in der Hauptsache unsere heutigen Kenntnisse über die Giftfische und deren Giftapparate.

---

[1]) Compt. rend. et Mémoires de la Société de Biologie. T. 2 (3). p. 125 (1856).

[2]) Arch. ital. de Biologie. T. 4. p. 72 (1883).

[3]) *Byerley*, Proceedings of the Literary and Philos. Soc. of Liverpool. Nr. 5. p. 156 (1849).

[4]) *A. Günther*, Catalogue of Fishes in the British Museum. London 1859—1870. The Study of Fishes. Edinburgh 1880. Artikel „Ichthyology" in der Encyclopaedia Britannica (1881). On a poison organ in a genus of Batrachoid Fishes. Proc. Zoolog. Society. p. 458 (1864).

[5]) *L. Gressin*, Contribution à l'étude de l'appareil à venin chez les poissons du Genre „Vive" (Trachinus). Thèse de Paris (1884).

[6]) *A. Bottard*, Les poissons venimeux. Thèse de Paris (1889). — Vgl. auch *J. Pellegrin*, Les poissons vénéneux. Thèse de Paris (1899). — *H. Coutière*, Poissons venimeux et Poissons vénéneux. Thèse de Paris (1899). — *N. Parker*, On the poison organs of Trachinus. Proc. Zool. Soc. London. p. 359 (1888).

Es empfiehlt sich, die Begriffe **„Giftfische“** und **„giftige Fische“** scharf zu unterscheiden und auseinander zu halten.

I. Unter Giftfischen, Pisces venenati s. toxicophori, „Poissons venimeux“ der französischen Autoren, sind nur diejenigen Fische zu verstehen und zu klassifizieren, welche einen besonderen Apparat zur Erzeugung des Giftes und dessen Einverleibung (Inokulation) besitzen.

II. Unter „giftige Fische“, schlechtweg „Poissons vénéneux“ der französischen Autoren, sind dagegen zu verstehen und einzureihen alle Fische, deren Genuß auch in frischem Zustande nachteilige oder gesundheitsschädliche Folgen haben kann.

Diese Kategorie zerfällt wiederum in zwei Unterabteilungen:

a) Fische, bei welchen das Gift auf ein bestimmtes Organ beschränkt ist (Barbe),

b) Fische, bei welchen das Gift im ganzen Körper verbreitet ist (Aalblut).

I. Giftfische, Pisces venenati sive toxicophori.

Bei den mit einem Giftapparate ausgestatteten Fischen unterscheidet man nach dem Vorgange *Bottards* und analog der Klassifikation der Giftschlangen zweckmäßig nach gewissen charakteristischen, morphologischen Kennzeichen der Giftapparate mehrere Unterklassen. Zunächst sind zu unterscheiden:

A. Fische, welche durch ihren **Biß** vergiften können;

B. Fische, welche durch **Stichwunden** (mit Giftdrüsen verbundene Stacheln) vergiften können;

C. Fische, welche ein giftiges **Hautsekret** in besonderen Hautdrüsen bereiten.

A. Ordnung Physostomi, Edelfische. Familie Muraenidae. Gattung Muraena.

Muraena helena L., die gemeine Muräne, findet sich im Mittelländischen Meere als einzige Art der Gattung Mureana.

Der am Gaumen befindliche, wohl ausgebildete Giftapparat[1]) von Muraena helena besteht aus einer ziemlich großen Tasche oder Schleimhautfalte, welche bei einer etwa meterlangen Muräne $^1/_2$ *cm*³ Gift enthalten kann und mit vier starken, konischen, leicht gebogenen, mit ihrer Konvexität nach vorn gerichteten, beweglichen und erektilen Zähnen versehen ist, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den Giftzähnen der Schlangen zeigen, jedoch nicht wie diese gefurcht oder von einem zentralen Kanal durchbohrt sind. Die Gifttasche ist mit den das Gift sezernierenden Epithelzellen ausgekleidet. Die Gaumenschleimhaut umschließt scheidenartig die Giftzähne und das Gift fließt zwischen den letzteren und jener in die

[1]) Vgl. hierzu *H. M. Coutière,* Sur la non-existence d'un Appareil à venin chez la Murène Hélène. Compt. rend. de la Soc. de Biologie. T. **54**. p. 787 (1902).

Wunde, wobei die Entleerung des Giftsekretes nicht wie bei den Schlangen durch Kontraktion einer besonderen Muskulatur bewirkt oder befördert wird.

Die ganze Anordnung des Giftapparates erinnert sehr an denjenigen der Schlangen und obgleich genauere Berichte über Vergiftungen durch den Biß dieser Tiere fehlen, so unterliegt es doch wohl kaum einem Zweifel, daß dieselben schwere Verwundungen verursachen können, die nicht nur auf rein mechanische Weise zustande kommen.

Über die Natur des Giftes und seine chemische Zusammensetzung ist nichts bekannt.

Die Wirkungen des Giftsekretes von Muraena helena sind bisher an Tieren nicht untersucht. In einem von *P. Vaillant*[1]) beschriebenen Falle soll ein Artillerist nach dem Biß dieses Fisches in eine stundenlang andauernde Ohnmacht (Syncope) verfallen sein. Ob diese als lähmende Wirkung des Giftes oder als die Folge des angeblich starken Blutverlustes aufzufassen ist, läßt sich nach der Beschreibung des Falles nicht beurteilen.

Die in den Tropen lebenden Arten von Muraena sollen mit ihrem kräftigen Gebiß selbst den Menschen angreifen.

B. Ordnung Acanthopteri, Stachelflosser.

Die in dieser Unterklasse der Giftfische aufgezählten Fische besitzen mit besonderen **Giftdrüsen** in Verbindung stehende **Stacheln**, welche entweder auf dem Rücken in Verbindung mit den Rückenflossen oder am Kiemendeckel oder auch am Schultergürtel sich befinden. An der Basis der Stacheln finden sich die das Giftsekret enthaltenden Behälter oder Reservoire, welche mit dem sezernierenden Epithel ausgekleidet sind.

Bottard, welcher die Giftorgane eingehend untersucht hat, unterscheidet nach morphologischen Merkmalen ihrer Giftapparate folgende Klassen von Giftfischen.

a) Der Giftapparat ist nach außen geschlossen. Es bedarf eines kräftigen mechanischen Eingriffes oder eines stärkeren Druckes auf die Stacheln oder auf die Giftreservoire, um die Entleerung des Giftes zu bewirken.

Synanceia brachio, Giftstachelfisch,
" verrucosa, Zauberfisch,
Plotosus lineatus,
Bagrus nigritus, Stachelwels.

b) Der Giftapparat ist halb geschlossen:

Thalassophryne reticulata,
" maculosa
(Muraena helena), vgl. oben.

c) Der Giftapparat ist offen:

Trachinus vipera, " draco, " radiatus, " araneus.	Trachinidae, Queisen.

[1]) *Bottard*, a. a. O. S. 153.

Cottus scorpius, Seeskorpion,
„ bubalis, Seebulle,
„ gobio, Kaulkopf, Koppen,
Callionymus lyra, Leierfisch,
Uranoscopus scaber, Himmelsgucker, Sternseher.
Trigla hirundo, gemeine Seeschwalbe,
„ gunardus, grauer Knurrhahn,
Scorpaena porcus, Meereber,
„ scrofa, Meersau.
Pterois volitans, Rotfeuerfisch, Truthahnfisch,
Pelor filamentosus, Sattelkopf,
Amphocanthus lineatus (Perca fluviatilis), Flußbarsch.

a) **Synanceia brachio Lacép.**[1]) Der Giftapparat, welcher aus einem die Einverleibung des Giftsekretes ermöglichenden Stachel, dem Giftreservoir und der Giftdrüse besteht, findet sich an der Rückenflosse. An letzterer befinden sich 13 starke und harte Stacheln, welche auf beiden Seiten in ihrer Längsachse mit Rinnen versehen sind. Im Ruhezustande liegen die Stacheln dem Rücken dicht an; sie werden aufgerichtet, wenn der Fisch bedroht wird oder sich zur Verteidigung anschickt. Die die Stacheln verbindende Membran umschließt diese scheidenartig und bedeckt die Spitzen derselben mit einem fibrösen, knopfartigen Gebilde. Zu beiden Seiten der Basis jeder der dreizehn Stacheln befinden sich die zylindrischen Giftreservoire, welche unter sich nicht in Verbindung stehen. Jeder Stachel hat demnach zwei Giftreservoire, so daß die Gesamtanzahl derselben 26 beträgt. Die Rinnen der Stacheln reichen bis an das Giftreservoir. Wenn von oben her ein genügend starker Druck auf den Stachel ausgeübt wird, so platzt das Giftreservoir und das in letzterem enthaltene Gift fließt den Rinnen entlang in die durch den Stachel verursachte Wunde. Zur Entleerung des Giftreservoirs ist demnach eine kräftige Druckwirkung von außen unerläßlich.

Die Giftreservoire einer 45 *cm* langen Synanceia brachio enthalten je etwa $^1/_2$ *cm*^{3} Gift; die dem zweiten und dritten Stachel zugehörigen Reservoire sind am besten entwickelt und diese Stacheln zeichnen sich auch durch ihre Größe und ihre Erektilität bis zur Vertikale vor den übrigen Stacheln aus. Infolge dieser Verhältnisse finden denn auch die Verwundungen vorwiegend durch diese Stacheln statt.

Das in den Reservoiren enthaltene giftige Sekret ist klar, beim lebenden Tier schwach bläulich gefärbt, besitzt keinen charakteristischen Geruch und reagiert sehr schwach sauer. Nach *Bottard* wird das Sekret nur sehr langsam, wenn überhaupt regeneriert, falls das Reservoir einmal entleert wurde.

Die Entleerung des Giftes nach außen erfolgt je nach dem auf das Reservoir ausgeübten Drucke mehr oder weniger heftig. *Bottard* sah das Gift bei dem Drucke, wie er durch Daumen und Zeigefinger auf das Reservoir ausgeübt werden kann, bis 1 *m* hoch herausspritzen.

---

[1]) Beschreibungen und Abbildungen der genannten Fische finden sich bei: *Lacépède*, Histoire nat. des Poissons. 22 Vols. Paris 1798—1805. — *Bottard*, a. a. O. — *v. Linstow*, Die Gifttiere und ihre Wirkung auf den Menschen. Berlin 1894. — *Brehms* Tierleben. — *P. Sartschenko*, Atlas des Poissons vénéneux (1886). Text russisch und französisch.

Plotosus lineatus C. et V.[1]), im Indischen Ozean und den tropischen Gegenden des Pazifischen Ozeans vorkommend, besitzt zwei Giftapparate, von denen der eine vor den Brustflossen, der andere vor der ersten Rückenflosse liegt. Dieselben bestehen aus den Drüsen und den zugehörigen, sägezahnartig gezackten, dünnen und leicht zerbrechlichen Stacheln, welche von einem bis fast an die Stachelspitzen reichenden Kanal dorchbohrt sind. Dieser kommuniziert frei mit dem Giftreservoir. Für die Entleerung des Giftsekretes in die Wunde ist es wegen des Verschlusses des Kanals an der Stachelspitze erforderlich, daß der Stachel in der Wunde abgebrochen wird, was infolge seiner Beschaffenheit und seines Baues auch immer erfolgt.

Der Giftapparat ist wie bei Synanceia nur defensiv zu verwenden und hat mit dem letzteren den kompletten Abschluß nach außen gemein.

b) **Thalassophryne reticulata Günther,** an der Küste von Panama. und **T. maculosa Günther,** hauptsächlich im Golfe von Bahia vorkommend, besitzen einen doppelten Giftapparat, einen an dem Kiemendeckel und einen zweiten auf dem Rücken dicht hinter dem Kopfe.

Das Os operculare, der Kiemendeckelknochen, besitzt an seinem Rande einen etwas nach oben gebogenen, konischen, stilettartigen Fortsatz oder Stachel, welcher von einem zentralen Kanale durchbohrt ist. Der Stachel steht in Verbindung mit dem Giftreservoir, so daß das in dem Reservoir befindliche Giftsekret durch den Kanal nach außen entleert werden kann. Eine besondere Muskulatur für die Entleerung des Giftes scheint nicht vorhanden.

Der auf dem Rücken befindliche Giftapparat besteht aus zwei mit entsprechenden Reservoiren kommunizierenden und ebenfalls zentral durchbohrten Stacheln. Letztere sind durch eine Membran verbunden und bilden so die erste Rückenflosse. Werden die Stacheln aufgerichtet, so fließt aus der peripheren Öffnung des zentralen Kanales das Gift aus.

Es handelt sich also bei Thalassophryne um den halb offenen Typus der Giftapparate bei Fischen.

c) Als charakteristisches Beispiel für den Bau und die morphologischen Verhältnisse der **offenen Giftapparate** kann der Giftapparat von Trachinusarten dienen.

Trachinus draco L., das Petermännchen, findet sich häufig an den europäischen Küsten und besizt wie Plotosus und Thalassophryne zwei Giftapparate, von welchen sich der eine am Kiemendeckel, der andere an der ersten Rückenflosse befindet. Ersterer ist der größere und die durch denselben hervorgebrachten Wunden sind gefährlicher als die durch den dorsalen Apparat verursachten.

Der Kiemendeckelstachel ist oben und unten mit Rinnen oder Furchen versehen (kanelliert). Die Rinnen stehen in Verbindung mit einem konischen, in dem Kiemendeckelknochen liegenden Hohlraum. Die Kiemenmembran überzieht den Stachel scheidenartig bis fast an seine Spitze. Die innere Fläche des durch diese Scheide und durch den Kiemenboden sowie durch den konischen Hohlraum gebildeten Blindsacks ist mit sehr großen sezernierenden Zellen ausgekleidet, durch deren Einschmelzen oder Verflüssigung[2]) das Gift entsteht.

Das Gift fließt zwischen der von der Kiemenmembran gebildeten Scheide und der Stütz- oder Basalmembran der sezernierenden Zellen nach außen ab.

---

[1]) Beschreibung und Abbildung bei *Cuvier* et *Valenciennes,* Histoire nat. des Poissons. T. 15. p. 420—421. Paris 1828—1849.

[2]) *Bottard,* a. a. O. S. 113—114.

Der dorsale Giftapparat besteht aus 5—7 Stacheln, welche durch eine Membran verbunden und von dieser scheidenartig umschlossen sind. Die Scheide ist mit den kanellierten, d. h. mit Rinnen versehenen (gefurchten) Stacheln verwachsen und nicht, wie das bei Synanceia brachio der Fall ist, bis zur Stachelbasis zurückstülpbar. Jeder Stachel ist auf beiden Seiten tief kanelliert. Über die Stachelrinnen zieht sich brückenartig die die Stacheln verbindende Membran, den Rändern der Rinnen fest anliegend. Durch den so gebildeten Kanal gelangt das Gift nach außen.

Die in der Tabelle auf S. 859 unter *c)* angeführten Fische weisen in dem Bau ihrer Giftapparate im allgemeinen analoge Verhältnisse auf, wie wir sie eben bei Trachinus draco kennen lernten.

* * *

Ganz allgemein scheinen Giftapparate nur bei kleinen und schwachen Giftfischen vorzukommen. Knochenfische sind häufiger mit diesen Schutzmitteln versehen als Knorpelfische. Unter den Knochenfischen finden wir bei den Acanthopteri die meisten Giftfische. Nicht alle mit Stacheln ausgerüsteten Fische haben Giftdrüsen. Nackthäuter besitzen solche Organe viel häufiger als die beschuppten Fische.

Die **Wirkungen der giftigen Sekrete** der genannten Fische bieten, soweit dieselben genauer untersucht sind, in ihren Grundzügen ähnliche Erscheinungen, die sich, wie es scheint, nur in quantitativer Hinsicht unterscheiden. Die lokalen Wirkungen bestehen in heftiger Schmerzempfindung und schnellem Anschwellen der Umgebung der Wunde. Diese Erscheinungen können sich über das ganze betroffene Glied erstrecken. Die Umgebung der Stichwunde färbt sich bald blau, nekrotisiert und wird gangränös. Häufig entwickeln sich Phlegmonen, die den Verlust eines oder mehrerer Phalangen eines verwundeten Fingers bedingen können.

Die Wirkungen des Giftes nach der Resorption sind noch nicht genügend erforscht, um ein abschließendes Urteil über das Wesen derselben zu gestatten. Nach den Angaben der meisten Autoren scheinen sie beim Warmblüter in erster Linie das Zentralnervensystem zu betreffen. Es treten Krämpfe ein, die vielleicht auf eine primäre Erregung des Zentralnervensystems zurückzuführen sind, worauf später Lähmung folgt.

Meerschweinchen und Ratten starben in der Regel nach einer Stunde, manchmal aber erst nach 14 bis 16 Stunden unter anscheinend heftigen Schmerzen, Konvulsionen und Lähmungserscheinungen.[1]) Die Wunden und deren Umgebung waren heftig entzündet und wurden gangränös. Gelegentlich breitet sich die Gangrän weiter aus, oder es treten Geschwüre und Phlebitis an dem betroffenen Gliede auf.

Vergiftungen bei Menschen, besonders bei Badenden, Fischern und Köchinnen, sind häufig. Die meist an den Füßen und Händen gelegenen Wunden werden rasch sehr empfindlich, die ganze Extremität schmerzt

[1]) *J. Dunbar-Brunton,* The poison-bearing fishes, Trachinus draco and Scorpaena scropha; the effects of the poison on man and animals and its nature. Lancet (1896). 29. August. Zentralbl. f. inn. Med. Nr. 51, S. 1318 (1896).

heftig, Erstickungsnot und Herzbeklemmung treten ein, der Puls wird unregelmäßig, es folgen Delirien und Konvulsionen, die im Kollaps zum Tode führen oder nach stundenlanger Dauer langsam verschwinden können.

Verwundungen durch Synanceia brachio haben beim Menschen schon wiederholt den Tod herbeigeführt. *Bottard*[1]) berichtet über fünf letal endende Fälle, welche sicherlich durch das Gift dieses Fisches verursacht waren und ohne weitere Komplikationen rasch tödlich verliefen.

Bei Fröschen sah *Pohl*[2]), der an diesen Tieren mit Trachinus- und Scorpaenagift experimentierte, niemals Krämpfe auftreten; auch konnte dieser Autor in keinem Falle eine anfängliche Steigerung der Reflexerregbarkeit wahrnehmen. *Pohl* stellte fest, daß beim Frosch die Herzwirkung des Giftes von Trachinus das ganze Vergiftungsbild beherrscht und daß die Symptome der Vergiftung — das Ausfallen spontaner Bewegungen, die Hypnose und die schließliche Lähmung auf Zirkulationsstörungen zurückzuführen sind. Die Wirkung des Trachinusgiftes auf das Herz äußert sich in der Verlangsamung der Schlagfolge bei anfänglich kräftigen Kontraktionen, die allmählich schwächer werden und schließlich ganz aufhören, wobei das Herz in Diastole still steht. Der Herzmuskel ist dann mechanisch, nur lokal oder überhaupt nicht mehr erregbar. Atropin und Koffein änderten an dem Verlauf der Vergiftung nichts; der Herzstillstand ist daher nicht auf eine Wirkung des Giftes auf die nervösen Apparate des Herzens zurückzuführen. Das Trachinusgift wirkt auf den Herzmuskel direkt lähmend. Die Erregbarkeit der Skelettmuskeln und der motorischen Nerven erleidet keine Änderung.

Die chemische Natur dieser Gifte ist ganz unbekannt. Ihr Nachweis läßt sich nur auf pharmakologischem Wege erbringen.

Die am Frosche gewonnenen Resultate erklären die beim Warmblüter gemachten Erfahrungen in befriedigender Weise. Es sind demnach die Krämpfe nicht auf eine direkte Wirkung des Trachinusgiftes auf das Zentralnervensystem zurückzuführen; sie sind vielmehr als Folgen des Darniederliegens der Zirkulation aufzufassen, infolgedessen es zu Erstickungskrämpfen kommen kann.

Das Gift von Scorpaena porcus wirkt nach *Pohl* qualitativ ganz wie das Trachinusgift, nur viel schwächer, und zeigt außerdem, auch beim Frosche, eine ausgesprochene lokale Wirkung. Letztere scheint nach *Briot*[3]) von einer nicht mit dem Herzgift identischen Substanz abhängig zu sein.

---

[1]) a. a. O. S. 78. Daselbst Zusammenstellung zahlreicher Vergiftungsfälle infolge von Verwundungen durch Synanceia brachio und andere Giftfische.

[2]) *J. Pohl*, Beitrag zur Lehre von den Fischgiften. Prager med. Wochenschr. Nr. 4 (1893).

[3]) Compt. rend. soc. biolog. T. **54**, p. 1169—1171. 1172—1174 (1902) und T. **55**. p. 623 (1903). Journ. de physiol. T. **5**. p. 271—282 (1903).

C. Cyclostomata, Rundmäuler.

Das Gift wird von **Hautdrüsen** bereitet. Es fehlen besondere Apparate, welche das Giftsekret dem Feinde einverleiben.

Petromyzon fluviatilis Lin., Flußneunauge, Pricke und **Petromyzon marinus Lin.**, Meerneunauge, Lamprete. Die Neunaugen sondern in gewissen Hautdrüsen ein giftiges Sekret ab, welches nach *Prochorow*[1]) und *Carazzani*[2]) gastroenteritische Erscheinungen, mit heftigen, bisweilen blutigen, ruhrartigen Diarrhöen, verursachen kann. Die chemische Natur der wirksamen Substanz ist unbekannt. Sie scheint durch Erhitzen nicht zerstört zu werden, da der Genuß einer aus Neunaugen bereiteten Suppe schwere Vergiftungssymptome an einer Frau und deren Kindern hervorrief. Die Neunaugen waren in diesem Falle nicht, wie das sonst üblich ist, vorher mit Salz bestreut und dann in einem Gefäße mit Wasser geschüttelt oder „gereinigt", d. h. von dem giftigen Hautsekret befreit worden.

II. Giftige Fische.

a) Das Gift ist nicht in besonderen Giftapparaten, sondern in einem der Körperorgane enthalten, nach deren Entfernung der Genuß des Fisches keinerlei nachteilige oder gesundheitsschädliche Folgen hat

Hierher gehören:

Barbus fluviatilis Agass. s. Cyprinus barbus L., die Barbe.
Schizothorax planifrons Heckel.
Cyprinus carpio L., der Karpfen.
Cyprinus Tinca Cuv., die Schleie.
Meletta thrissa Bloch s. Clupea thrissa, die Borstenflosse.
Meletta venenosa Cuv. s. Clupea venenosa, die Giftsardelle.
Sparus maena L., Laxierfisch.
Abramis brama L., der gemeine Brachsen.
Balistes capriscus Gmel., der Drückerfisch.
Balistes vetula Cuv., die Vettel, Altweiberfisch.
Ostracion quadricornis L., der gemeine Kofferfisch, Vierhorn.
Thynnus thynnus L. s. Th. vulgaris C. V., gemeiner Tun.
Sphyraena vulgaris C. V., der gemeine Pfeilhecht.
Esox lucius L., der gemeine Hecht.
Tetrodon pardalis Schlegel und andere Tetrodonarten, Kröpfer oder Vierzähner.
Orthagoriscus mola Bl. Sch., der Sonnenfisch, Meermond, Mondfisch, Schwimmender Kopf.

Bei den genannten Fischen ist das Gift hauptsächlich auf die Geschlechtsorgane oder deren Produkte beschränkt, doch enthalten auch andere Organe, vornehmlich die Leber sowie Magen und Darm, zuweilen das Gift, dann aber in viel geringerer Menge.

---

[1]) Pharm. Jahresber. (1883/84). S. 1187.
[2]) *Virchows* Jahresber. (1893). I. S. 431.

Die durch diese Kategorie von Fischen verursachten Vergiftungen hat man auch mit dem Namen **„Ciguatera"** bezeichnet. Unter diesem, von spanischen Ärzten auf den Antillen eingeführten und von den französischen Autoren[1]) übernommenen Namen sind alle durch den Genuß von frischen, vor kurzem dem Wasser entnommenen Fischen verursachten Vergiftungen zu verstehen. Es handelt sich demnach um Vergiftungen durch im Organismus lebender Fische normaler-, d. h. physiologischerweise gebildete Stoffwechselprodukte. Ciguatera und Ichthyismus sind also nicht identische Begriffe.

Barbus fluviatilis Agass, s. Cyprinus barbus L., die gewöhnliche Barbe, ist der bekannte giftige Fisch, welcher die sogenannte **Barbencholera** verursacht.[2]) Während man früher die Erkrankungen nach dem Genuß der Barbe auf Krankheiten des Fisches selbst oder auf die Beschaffenheit seiner Nahrung zurückführen wollte, steht jetzt die Tatsache fest, daß nur nach dem Genuß des Barbenrogens die Erscheinungen, welche man unter dem Namen Barbencholera zusammenfaßt, beobachtet werden. Die Symptome der Vergiftung bestehen in Übelkeit, Nausea, Erbrechen, Leibschmerzen und Diarrhöe und sind denjenigen der Cholera nostras ähnlich.

Hesse experimentierte mit Barbenrogen an Menschen und Tieren. Er berichtet im ganzen über 110 Versuche an Menschen, wobei in 67 Fällen keinerlei oder doch nur sehr leichte Erscheinungen auftraten.

In zwei von *Trapenard*[3]) beschriebenen schweren Fällen waren unstillbares Erbrechen und profuse Diarrhöen mit darauf folgender, lange dauernder Somnolenz die Hauptsymptome.

In der Literatur finden sich keine Angaben über letal verlaufene Fälle.

Die Barbe bzw. deren Rogen ist am giftigsten zur Laichzeit, weshalb es in Italien verboten ist, um diese Zeit — März bis Mai — Barben zum Verkauf zu bringen.[4]) Massenvergiftungen durch Barbenrogen sind in Deutschland und in Frankreich verschiedentlich beobachtet und beschrieben worden. Die chemische Natur der wirksamen Substanz ist unbekannt.

Ordnung Plectognathi, Haftkiefer.

Familie Gymnodontes.

Die Gattungen Tetrodon, Triodon und Diodon kommen hauptsächlich in den tropischen Meeren, aber auch in den gemäßigten Meeren und in Flüssen vor und zeichnen sich außer durch ihre Giftigkeit durch ihr absonderliches Äußeres aus. Sie sind häufig mit mehr oder weniger zahlreichen Stacheln ausgerüstet. Tetrodon Honkenyi Bloch, welcher am Kap

[1]) *Coutière,* p. 107—143. *Pellegrin,* p. 16. Vgl. S. 857. Anm. 6.

[2]) Die ältere Literatur siehe bei *H. F. Autenrieth,* Das Gift der Fische. S. 42 bis 46 (1833), sowie bei *Carl Gustav Hesse,* Über das Gift des Barbenrogens (1835).

[3]) Journal de Chimie méd. p. 584 (1851).

[4]) *Kobert,* Über Giftfische und Fischgifte. Vortrag. S. 14 (1905).

der guten Hoffnung und in Neu-Kaledonien vorkommt, ist dort unter dem Namen „Toad-fish“ bekannt. Sein Genuß hat wiederholt schwere Vergiftungen verursacht.

Das Vorkommen von Fischen, welche unter allen Umständen giftige Eigenschaften besitzen, ist durch die eingehenden Untersuchungen des in Japan unter dem Namen **Fugugift** bekannten und sehr wirksamen, dort zahlreiche Todesfälle verursachenden Giftes verschiedener Tetrodon- und Diodonarten durch *Ch. Rémy*[1]) und *D. Takahashi* und *Y. Inoko*[2]) sicher festgestellt.

Die verschiedenen Spezies von Tetrodon enthalten alle, mit Ausnahme von T. cutaneus, qualitativ gleich wirkende Gifte.

Von den einzelnen Organen ist der Eierstock bei weitem am giftigsten, bei T. cutaneus ist er jedoch giftfrei. Der Hoden enthält bei manchen Spezies nur sehr geringe Mengen des Giftes. Die Leber ist weniger giftig als der Eierstock. Die übrigen Eingeweideorgane zeigen im allgemeinen eine minimale Giftigkeit und sind bei einigen Arten ganz ungiftig. In den Muskeln aller untersuchten Spezies war das Gift nicht nachzuweisen. Im Blute von Tetrodon pardalis und T. vermicularis fanden sich geringe Mengen des Giftes.

Die chemische Untersuchung der frischen Ovarien von T. vermicularis ergab, daß das Gift in Wasser und wässerigem Alkohol, nicht aber in absolutem Alkohol, Äther, Chloroform, Petroleumäther und Amylalkohol löslich ist.

Dasselbe wird weder durch Bleiessig noch durch die bekannten Alkaloidreagenzien gefällt, diffundiert sehr leicht durch tierische Membranen und wird durch kurzdauerndes Kochen seiner wässerigen Lösung nicht zerstört. Aus diesem Verhalten des Giftes ergibt sich, daß das Fugugift weder ein Ferment noch ein Toxalbumin noch eine organische Base ist. Durch längere Zeit fortgesetztes Erwärmen auf dem Wasserbade, besonders in saurer, aber auch in alkalischer Lösung, wird das Gift in seiner Wirkung abgeschwächt und kann schließlich ganz zerstört werden.

Zur **Darstellung des wirksamen Körpers** verfuhren *Takahashi* und *Inoko* in der Weise, daß sie die frischen Eierstöcke zuerst mit Äther, dann mit absolutem Alkohol erschöpften; hierauf wurde das zerkleinerte Material mit destilliertem Wasser bei Zimmertemperatur extrahiert, die wässerigen Auszüge mit Bleiessig gefällt, das Filtrat vom Bleiniederschlag durch Schwefelwasserstoff von überschüssigem Blei befreit und hierauf mit Phosphorwolframsäure, Kaliumquecksilberjodid oder Quecksilberchlorid die durch diese Reagenzien fällbaren Substanzen, hauptsächlich Cholin, entfernt. Die Filtrate von den letztgenannten Fällungen wurden im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure zur Trockne abgedampft und der Rückstand

[1]) *Ch. Rémy*, Compt. rend. de la Soc. de Biologie (7. sér.). T. 4. p. 263 (1883).

[2]) Archiv f. exp. Path. Bd. 26. S. 401 und 453 (1890). Vgl. auch Mitteilungen der med. Fakultät Tokio. Bd. 1. S. 375 (1892). Daselbst sehr gute farbige Abbildungen dieser Fische und Kasuistik der Vergiftungen beim Menschen.

mit absolutem Alkohol mehrmals extrahiert. Der in absolutem Alkohol unlösliche Teil des Rückstandes stellte eine mit anorganischen Salzen vermengte, gelblich gefärbte, amorphe Masse dar und erwies sich als stark giftig.

Y. Tahara[1]) hat die von *Takahashi* und *Inoko* begonnene chemische Untersuchung des Fugugiftes fortgesetzt und dabei einen pharmakologisch stark wirksamen, in farblosen Nadeln kristallisierenden Körper von neutraler Beschaffenheit, das **Tetrodonin**, und eine amorphe, ebenfalls stark wirksame Substanz von saurem Charakter, die **Tetrodonsäure**, gefunden.

Aus den Dialysaten von zerquetschtem Rogen des frischen Fisches hat *Tahara*, nach dem Reinigen mittelst Bleiessig, durch Zusatz von Alkohol eine kristallinische Masse erhalten, die ein Gemenge von Tetrodonin und Tetrodonsäure darstellte. Die Trennung dieser beiden Substanzen geschah durch Behandlung der wässerigen Lösung der Kristallmasse mit Silberacetat, wobei das schwer lösliche tetrodonsaure Silber ausfiel. Aus dem Filtrat von letzterem wurde das Tetrodonin durch Fällung mittelst Alkohol gewonnen.

Das Tetrodonin ist geruch- und geschmacklos, reagiert neutral, löst sich leicht in Wasser, schwer in konzentriertem Alkohol. Es ist unlöslich in Äther, Benzol und Schwefelkohlenstoff. Die wässerige Lösung wird nicht durch Platinchlorid, Goldchlorid, Phosphorwolframsäure, Sublimat und Pikrinsäure gefällt.

Die **Wirkungen des Fugugiftes** bestehen in einer bald eintretenden und sich bis zur vollkommenen Funktionsunfähigkeit steigernden Lähmung gewisser Gebiete des Zentralnervensystems, wobei zuerst das Respirationszentrum und dann das vasomotorische Zentrum betroffen wird. Gleichzeitig entwickelt sich eine curarinartige Lähmung der peripheren motorischen Nervenendigungen, welche beim Frosche eine vollständige werden kann. Das Herz wird von dem Gifte nicht direkt beeinflußt und schlägt noch nach bereits eingetretenem Atemstillstande. Infolge der Lähmung des Gefäßnervenzentrums sinkt der Blutdruck. Der Puls erfährt eine allmähliche Verlangsamung. Krämpfe treten im ganzen Verlaufe der Vergiftung nicht ein, was wahrscheinlich auf die bestehende Lähmung der motorischen Endapparate zurückzuführen ist.

Die Sektionsbefunde ließen keinerlei charakteristische Veränderungen an den Organen erkennen.

Die bei Vergiftungen von Menschen mit Fugugift beobachteten Symptome stimmen im wesentlichen mit den Ergebnissen der Tierversuche von *Takahashi* und *Inoko* überein. Gastro-enteritische Erscheinungen sind beobachtet worden, fehlen aber meistens. Die lebensgefährliche, rasch tödlich verlaufende Vergiftung, die sich durch Cyanose, kleinen Puls, Dyspnoe, Schwindel, Ohnmacht, Sinken der Körpertemperatur kennzeichnet, läßt die Wirkung des Giftes auf das Zentralnervensystem deutlich erkennen.

[1]) Über die giftigen Bestandteile des Tetrodon. Zeitschr. d. med. Ges. in Tokio. Bd. 8. Heft 14. Ref. bei *Maly*, Jahresber. über die Fortschritte der Tierchemie. Bd. 24. S. 450 (1894).

In den männlichen Geschlechtsprodukten einiger hierauf untersuchter Fische finden sich gewisse **Protamine,** welche in dem Sperma an Nukleinsäure gebunden sind und sich leicht rein darstellen lassen.

A. Kossel und seine Schüler haben die oben genannten Körper, mit Ausnahme des Protamins von *Miescher*, zuerst genauer untersucht und auf ihre pharmakologischen Wirkungen geprüft. Sie fanden, daß das **Clupein** bei intravenöser Injektion in Mengen von 0·15—0·18 *g*, das **Sturin** in Mengen von 0·20—0·25 *g* an etwa 10 *kg* schweren Hunden bedeutende und rasch eintretende Erniedrigung des Blutdruckes und gleichzeitig Zunahme der Atmungsfrequenz mit Vertiefung der einzelnen Respirationen bewirkten.[1]) Größere Gaben als die genannten führen unter allmählicher Abnahme der Frequenz und der Tiefe der Atmung zum Respirationsstillstand und zum Tode.

Die Endprodukte der hydrolytischen Spaltung der Protamine, die von *Kossel* „Hexonbasen" genannten Körper Arginin, Histidin und Lysin, zeigten keine Wirkung auf Blutdruck und Respiration.

Die oben geschilderten Wirkungen des Clupeins und des Sturins sind also dem ganzen Protaminmolekül eigen. Sie betreffen anscheinend das Zentralnervensystem.

Die bakterizide Wirkung des Sturins wurde von *H. Kossel*[2]) im Jahre 1898 studiert.

b) Das Gift ist im ganzen Organismus verbreitet. Ordnung Physostomi, Familie Muraenidae.

Neuere Untersuchungen[3]) haben gezeigt, daß in dem **Blute** aller darauf untersuchter Muräniden ein Stoff vorhanden ist, welcher bei subkutaner, intravenöser und intraperitonealer Injektion den Tod der Versuchstiere herbeiführen kann; aber auch nach stomachaler Einverleibung ist das Aalblut, falls es in genügend großer Menge in den Magen gelangt, für den Menschen giftig, wie ein von *F. Pennavaria*[4]) beschriebener Fall beweist. Ein Mann, welcher das frische Blut von 0·64 *kg* Aal mit Wein vermischt trank, erkrankte schwer. Die Symptome bestanden in heftigem Brechdurchfall, Atmungsbeschwerden und cyanotischer Verfärbung des Gesichtes.

Das Serum des Muraenidenblutes unterscheidet sich schon durch einen nach 10—30 Sekunden wahrnehmbaren brennenden und scharfen Geschmack von dem Serum anderer Fische. Vielleicht handelt es sich dabei eher um eine lokale Reizung als um eine Geschmacksempfindung.

Der im Serum vorhandene giftige Körper, welchem *A. Mosso* den Namen „**Ichthyotoxin**" beigelegt hat, muß vorläufig zur Gruppe der

---

[1]) *W. H. Thompson,* Die physiologische Wirkung der Protamine und ihrer Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **29**. S. 1 (1900).

[2]) Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten. Bd. **27**. S. 36 (1898).

[3]) *A. Mosso,* Die giftige Wirkung des Serums der Muraeniden. Archiv f. exp. Patholog. u. Pharmak. Bd. **25**. S. 111 (1888). *Springfeld,* Wirkung des Blutserums des Aales. Inaug.-Diss. Greifswald 1889.

[4]) Il Farmacisto italiano. Vol. **12**. p. 328 (1888).

sogenannten Toxalbumine gezählt werden. Erhitzen des Serums vernichtet dessen Wirksamkeit; gleichzeitig geht der brennende Geschmack verloren. Seine Wirksamkeit wird durch organische Säuren, schneller und vollständiger durch Mineralsäuren, aber auch durch Einwirkung von Alkalien aufgehoben. Pepsin-Salzsäure (künstliche Verdauung) vernichtet nach *U. Mosso*[1]) ebenfalls seine Wirksamkeit. Der wirksame Bestandteil ist in Alkohol unlöslich und dialysiert nicht. Er verträgt das Eintrocknen bei niederer Temperatur. Intraperitoneal oder subkutan injiziert, tötet das Serum die Versuchstiere rasch. Das Serum von Conger myrus und Conger vulgaris ist weniger wirksam als dasjenige von Anguilla und Muraena.

Über die chemische Natur des Ichthyotoxins ist nichts Näheres bekannt.

Die **Wirkungen des Serums** von Anguilla, Conger und Muraena hat *Mosso* an Hunden, Kaninchen, Meerschweinchen, Tauben und Fröschen studiert. Diese Wirkungen können auch zum **Nachweis** von Aalserum und dessen Gift dienen.

Ein Hund von 15·2 *kg* Körpergewicht wurde nach der Injektion von 0·5 cm^3 frischem Anguillaserum in die Vena jugularis sofort sehr unruhig und konnte sich bald nicht mehr aufrecht halten. Nach zwei Minuten traten Konvulsionen ein und die Respiration stand still. Nach fünf Minuten war der Kornealreflex erloschen.

Die Sektion ließ, wie in allen weiteren Versuchen, keine für diese Vergiftung charakteristischen Veränderungen erkennen, abgesehen von dem Blute, welches nicht geronnen war.

Weitere Versuche ergaben, daß schon 0·02 cm^3 des Serums pro Kilogramm Körpergewicht genügen, um bei Hunden den Tod herbeizuführen.

Bei einem 1·03 *kg* schweren Kaninchen bewirkten 0·3 cm^3 Muraenaserum, in die Jugularis injiziert, den Tod in $2^1/_2$ Minuten. Die Respirationsfrequenz war gleich nach der Injektion gesteigert; das von den Fesseln befreite Tier fiel auf die Seite und war nach kurzdauernden Krämpfen gelähmt.

Meerschweinchen gingen $^1/_2$—$1^1/_2$ Stunden nach der Injektion von 2 bzw. 1 cm^3 Anguillaserum in die Bauchhöhle unter Dyspnoe und Respirationsstillstand zugrunde. Auch bei diesen Tieren zeigten sich die bei Hunden und Kaninchen beobachteten Lähmungserscheinungen und Respirationsanomalien. Das Herz schlug noch nach bereits eingetretenem Respirationsstillstand. Bei dieser Art der Einverleibung zeigte sich, wie auch meistens nach der subkutanen Injektion, eine lokale Wirkung des Giftes. Die Injektionsstelle und die derselben benachbarten Gewebe waren entzündet; in der Bauchhöhle fand sich blutig gefärbtes Exsudat.

An Fröschen bewirkt die subkutane Injektion von Aalserum eine Herabsetzung der Erregbarkeit der motorischen Nerven und der Muskeln. Auf das Herz dieser Tiere scheint das Aalserum nicht direkt zu wirken.

---

[1]) *U. Mosso*, Ricerche sulla natura del veleno che si trova nel sangue dell'anguilla. Rendiconti della R. Accademia dei Lincei. Vol. 5. p. 804—810 (1889).

Eine genauere Analyse der Wirkungen des Muraenidenserums auf Warmblüter ergibt folgendes.

Die Respiration wird zunächst beschleunigt, später herabgesetzt. Diese Wirkung beruht anscheinend auf einer primären Erregung und darauffolgenden Lähmung des Respirationszentrums. Künstliche Atmung vermag, wenn nicht allzu große Gaben injiziert wurden, das Leben zu erhalten.

Die Zirkulation wird durch kleinere, nicht tödliche Gaben in weit geringerem Maße als die Respiration beeinflußt. Bei Hunden erfolgt zuerst eine Verstärkung der Herzschläge und eine Abnahme ihrer Frequenz. Später wird der Puls stark beschleunigt. Diese Erscheinungen beruhen wahrscheinlich auf einer anfänglichen Erregung mit darauffolgender Lähmung des Vaguszentrums.

Größere Gaben wirken direkt lähmend auf das Herz. Der Blutdruck sinkt dann sehr rasch. Über das Verhalten der Gefäße lassen sich aus den bis jetzt vorliegenden Versuchen keine sicheren Schlüsse ziehen.

Das Ichthyotoxin hebt die Gerinnbarkeit des Blutes auf.

Die Wirkungen des Muraenidenserums auf das Nervensystem äußern sich in Lähmungserscheinungen der verschiedenen Gebiete, bei deren Zustandekommen jedoch auch die direkte Wirkung des Giftes auf die Muskeln (vgl. oben Frosch) berücksichtigt werden muß. Die Wirkungen auf das Nervensystem sind direkte und unabhängig von der Zirkulation. Beim Frosche kann z. B. die Erregbarkeit des Nervus ischiadicus total erloschen sein zu einer Zeit, da das Herz noch kräftig schlägt.

Die Wirkungen des Muraenidenserums erinnern in manchen Punkten stark an die Wirkungen der Schlangengifte, insbesondere bezüglich der Wirkung auf die Respiration, auf den Blutdruck und auf das Blut.

Die schon oben (S. 864) angeführten Neunaugen, Petromyzon fluviatilis und Petromyzon marinus, besitzen nach den Angaben einiger Autoren wie die Muraeniden in ihrem Blute ein dem Ichthyotoxin ähnlich wirkendes Gift, welches im Serum gelöst enthalten ist. *Cavazzani*[1]) experimentierte an Fröschen, Kaninchen und Hunden und sah bei diesen Tieren nach Injektion von Petromyzonserum Somnolenz und Apathie sowie die charakteristischen Wirkungen des Muraenidenserums auf die Respiration eintreten.

Das Serum von Thynnus thynnus L. s. Th. vulgaris C. et V., des gemeinen Tuns und anderer Tunarten bewirkt nach *Maracci*[2]) bei seiner intravenösen oder intraperitonealen Injektion an Hunden ähnliche Vergiftungserscheinungen wie das Aal- und Petromyzonserum.

---

[1]) *E. Cavazzani*, Arch. ital. de Biologie. T. 18. p. 182—186 (1893).

[2]) *Maracci*, Sur le pouvoir toxique du sang du Thon. Arch. ital. de Biologie. T. 16. p. 1 (1891).

Wirbellose Tiere, Avertebrata.

Ordnung Asiphoniata.

Muscheltiere, Lamellibranchiata.

Eine große Anzahl älterer Beobachtungen über Miesmuschelvergiftungen findet sich in einer im Jahre 1851 erschienenen Arbeit von *Chevalier* und *Duchesne*[1]) sowie auch bei *Orfila*.[2]) Es kann nach diesen Berichten nicht daran gezweifelt werden, daß ganz frische, lebende Muscheln, bei welchen postmortale Zersetzungen oder Veränderungen als Ursache der Giftigkeit sicher ausgeschlossen waren, unter bestimmten, noch nicht näher bekannten Bedingungen und Verhältnissen giftige Eigenschaften annehmen können, und zwar schon in dem Wasser, in welchem sie leben.

Meistens werden ganze Familien oder sonst wie zusammen hausende Menschengruppen vergiftet. Es kommt dann zu den wiederholt beobachteten Massenvergiftungen durch Muscheln.

Das größte Interesse bietet eine Reihe von Muschelvergiftungen, denen im Oktober 1885 mehrere Werftarbeiter auf der Kaiserlichen Werft in Wilhelmshaven zum Opfer fielen.

Die Wilhelmshavener Fälle wurden von *Schmidtmann* beobachtet und dessen an *Virchow* gemachte Mitteilungen von letzterem veröffentlicht.[3]) Von den am Boden einiger Schiffe anhaftenden Muscheln nahmen mehrere Arbeiter verschiedene Mengen mit nach Hause, kochten und aßen dieselben mit ihren Familien. Im Laufe der Nacht erkrankte eine ganze Anzahl der Arbeiter und ihrer Familienmitglieder. Im ganzen wurden 19 Fälle beobachtet, von denen vier letal verliefen.

Die Symptome waren in allen Fällen die gleichen und bestanden in früher oder später, je nach der Menge der verspeisten giftigen Muscheln, auftretendem Gefühl des Zusammenschnürens im Halse, Stechen und Brennen zunächst in den Händen, später auch in den Füßen, Benommensein und einem eigenartigen Gefühl in den Extremitäten, „als wollten sich die Glieder heben". Der Puls war hart, die Frequenz desselben 80 bis 90. Körpertemperatur normal; die Pupillen groß und reaktionslos, die Sehkraft nicht vermindert. Das Sprechen war sehr erschwert. Gefühl der Schwere und Steifheit in den Beinen, Fehlgreifen beim Versuch Gegenstände zu fassen, Übelkeit und Erbrechen waren weitere Symptome der Vergiftungen. Die Patienten litten an Angstanfällen und klagten über Kältegefühl bei gleichzeitigem, reichlichem Schweiß. Der Tod erfolgte bei vollem Bewußtsein innerhalb 45 Minuten bis 5 Stunden nach dem Genuß der Muscheln.

Die Organe der Verstorbenen wurden von *Virchow* untersucht. Er berichtet darüber: „Die Dünndarmschleimhaut war stark geschwollen und rot, auch war eine reichliche Menge schleimiger, epithelhaltiger Massen abgesondert. Das Bild deutet auf einen starken Irritationszustand der Schleimhaut. Weiter war die starke Milzschwellung auffallend; es bestand Hyperplasie der Milz mit starker Vergrößerung der Follikeln, also ebenfalls ein Zustand, der auf starke Irritation deutet. Die Leber zeigte hämorrhagische Infarkte. Am Gehirn war, abgesehen von einer mäßigen Hyperämie, nichts Abnormes wahrzunehmen.

---

[1]) Ann. d'Hygiène publique. p. 387 (1851).

[2]) *Orfila*, Traité de poisons. p. 508—518. Paris 1818.

[3]) Deutsche med. Wochenschr. 11. November und 2. Dezember 1885.

Die oben geschilderte Symptomatologie ist charakteristisch für die paralytische Form der Vergiftungen durch Muscheln[1]), welche sich durch akute periphere Lähmungserscheinungen kennzeichnet und manche Ähnlichkeit mit der Curarevergiftung aufweist.

Die Ursachen des Giftigwerdens der Muscheln[2]) sind noch nicht mit Sicherheit festgestellt. Es existiert darüber eine Menge Erklärungsversuche, welchen jedoch vorläufig nur die Bedeutung von Hypothesen beigelegt werden kann.

Den Beweis dafür, daß die Stagnation des die Muscheln umgebenden Wassers die Ursache der Giftigkeit sein kann, erbrachte in Übereinstimmung mit den früheren Angaben von *Crumpe* und *Permewan*[3]) *Schmidtmann*[4]), indem er giftige Muscheln aus dem Hafen in offenes Seewasser brachte und umgekehrt frische, ungiftige Muscheln in den Binnenhafen überführte, wobei er nach längerem Aufenthalte der Tiere am neuen Standorte im ersteren Falle die Giftigkeit verschwinden, im letzteren Falle eintreten sah. Zum gleichen Resultate gelangte kürzlich *Thesen*[5]) in Christiania, welcher auch nachwies, daß die Bodenbeschaffenheit an dem Standorte der Muscheln für das Giftigwerden derselben ohne Bedeutung ist.

Wir müssen jetzt annehmen, daß in dem die Muscheln umgebenden stagnierenden Wasser eine bestimmte, nicht zu jeder Zeit vorhandene Verunreinigung sich findet, welche entweder durch *a)* Hervorrufen einer Krankheit bei den Muscheln die Bildung des Giftes im Organismus verursacht, oder daß *b)* die in dem Wasser vorhandene Verunreinigung selbst das Gift ist, und daß letzteres von den Muscheln nur aufgenommen und aufgespeichert wird.

Die Fähigkeit der Muscheln, aus dem Wasser nicht allein das atropin-curarinartig wirkende, für die Wirkung an Menschen und Tieren verantwortliche, spezifische Gift, sondern auch andere stark wirksame Substanzen (Curare, Strychnin) aus dem Wasser aufzunehmen und aufzuspeichern, hat *Thesen* durch Aquariumversuche dargetan. Hierbei blieben die Muscheln scheinbar ganz gesund.

Über die **chemische Natur des Giftes** ist wenig bekannt. *Salkowski*[6]) fand, daß dasselbe mittelst Alkohol aus den Muscheln extrahiert werden kann und durch Erhitzen auf 110° seine Wirksamkeit nicht verliert, während Einwirkung von Natriumkarbonat in der Wärme das Gift zerstört. *Brieger*[7]) isolierte aus giftigen Muscheln einen von ihm „Mytilotoxin" genannten Körper von der Formel $C_6H_{15}NO_2$, welcher nach diesem Autor das spezifische, curarinähnlich wirkende Gift der Miesmuschel sein

[1]) Vgl. hierzu besonders *J. Thesen*, Über die paralytische Form der Vergiftung durch Muscheln. Archiv f. exp. Patholog. u. Pharmak. Bd. **47**. S. 311 (1902).

[2]) Vgl. *Husemann*, Handbuch der Toxikologie. S. 277 (1862).

[3]) Lancet. Vol. **2**. p. 568 (1888).

[4]) Zeitschr. f. Medizinalbeamte. Nr. 1 und 2 (1887). Vgl. auch *Virchows* Archiv. Bd. **112**. S. 550 (1888).

[5]) Archiv f. exper. Path. u. Pharmak. Bd. **47**. S. 311—359 (1902).

[6]) *Virchows* Archiv. Bd. **102**. S 578—593 (1885).

[7]) Deutsche med. Wochenschr. Bd. **11**. S. 907. Nr. 53 (1885). Die Ptomaine. Bd. **3**. S. 65—81 (1886). *Virchows* Archiv. Bd. **115**. S. 483 (1889).

soll, ein in Würfeln kristallisierendes Golddoppelsalz vom Schmelzpunkt 182° bildete und bei der Destillation mit Kalilauge Trimethylamin abspaltete. Ob in dem „Mytilotoxin" in der Tat der wirksame Körper der giftigen Muscheln vorliegt, muß vorläufig noch dahingestellt bleiben. *Thesen*[1]) konnte bei der Verarbeitung eines großen Materials, in Portionen von je 5 *kg* giftiger Muscheln, in keinem Falle das „Mytilotoxin" aus diesen isolieren. Mäuse gingen an den Wirkungen des von *Thesen* nach dem Verfahren von *Brieger* aus Giftmuscheln dargestellten Giftes an Herzlähmung zugrunde; die von den Autoren beschriebene curarin-atropinartige, lähmende Wirkung des Muschelgiftes auf die Respiration sah *Thesen* bei seinen Tierversuchen mit dem gereinigten Gifte nicht eintreten.

Richet[2]) hat neuerdings einen von ihm **„Mytilocongestin"** genannten Körper, angeblich in Muscheln vorkommend, als Träger der Giftwirkung beschrieben.

Die Lokalisation des Giftes im Organismus der Muschel betreffend, ist zu sagen, daß *Wolff*[3]) dasselbe ausschließlich in der Leber fand. Sofern es sich um die Aufnahme des präformierten Giftes aus dem Wasser handeln sollte, würde sich eine derartige Lokalisation des Giftes im Einklange mit den Erfahrungen mit mancherlei Giften bei anderen Tieren finden. Die Tatsache, daß die Leber die verschiedensten Gifte zurückhalten kann, steht fest.

* *
*

Bei den Vergiftungen mit **Austern,** Ostrea edulis, ist es nach dem vorliegenden literarischen Material schwer zu entscheiden, inwiefern die Erscheinungen bei derartigen Fällen auf die Anwesenheit eines spezifischen, dem Muschelgift ähnlichen, vielleicht mit diesem identischen Gifte oder aber auf Fäulnisgifte zurückzuführen sind.

Gliederfüßer, Arthropoda.

1. Klasse. Spinnentiere, Arachnoidea.

Die Giftigkeit mancher Arachnoideen ist durch zahlreiche Untersuchungen und Mitteilung vieler glaubwürdiger Beobachtungen heute mit Sicherheit festgestellt. Die Giftapparate sind ebenfalls genauer untersucht und nur über die chemische Natur der betreffenden Gifte sind unsere Kenntnisse noch mangelhaft, was wohl hauptsächlich auf die große Schwierigkeit der Beschaffung ausreichender Mengen des nötigen Tiermaterials zurückzuführen ist. Am besten bekannt und in bezug auf die uns hier interessierenden Verhältnisse am genauesten untersucht ist die, eine Ordnung der Arachnoideen bildende

[1]) a. a. O. S. 359.

[2]) Compt. rend. soc. biolog. T. **62**. p. 358—60; Annal. de l'Institut *Pasteur*. T. **21** (1907). *Malys* Jahresber. Bd. **37**. S. 802 (1908).

[3]) *M. Wolff*, Die Lokalisation des Giftes in den Miesmuscheln. *Virchows* Archiv. Bd. **103**. S. 187—203 (1886).

a) Ordnung Scorpionina.

Arthrogastra, Gliederspinnen.

Der Giftapparat der Skorpione liegt in dem letzten Segmente des aus zahlreicheren Gliedern zusammengesetzten, schmalen und sehr beweglichen Abdomens und besteht aus einer das Gift sezernierenden, paarigen, birnförmigen, in eine harte Hülle eingeschlossenen **Giftdrüse** und dem **Stachel.** Die kapselartige Hülle endigt in einer scharfen, gekrümmten Spitze. Die Ausführungsgänge der Drüse liegen in dem Stachel und münden unterhalb der Stachelspitze mit zwei kleinen Öffnungen. Die Drüse ist von einer Schicht quergestreifter Muskeln umgeben, durch deren willkürlich erfolgende Kontraktion das Giftsekret nach außen entleert werden kann.

Die Einverleibung des Giftes geschieht in der Weise, daß der Skorpion das Abdomen hoch emporrichtet und dann bogenförmig nach vorn biegt, während er seine Beute mit den Kiefern festhält, das zu stechende Tier also vor sich hat.

Nach erfolgtem Stiche, durch welchen das Gift dem Beutetier oder dem Gegner einverleibt wird, bleibt der Stachel meistens noch geraume Zeit in der Wunde, während das Sekret der Giftdrüse durch den mittelst Kontraktion der sie umhüllenden Muskulatur bewirkten Druck in die Stichwunde gepreßt wird (*Joyeux-Laffuie*).[1]

Die chemische Natur der in dem Giftsekret der Skorpione vorkommenden wirksamen Stoffe ist unbekannt.

Die Wirkungen des Sekretes sind dagegen durch Beobachtungen an vergifteten Menschen und durch Versuche an Tieren in ihren Grundzügen bekannt, doch fehlt bis jetzt eine genauere pharmakologische Analyse derselben. Dabei ist zu berücksichtigen, daß, wie bei den Schlangengiften, auch hier die Gifte verschiedener Spezies wahrscheinlich quantitative und qualitative Unterschiede in ihren Wirkungen aufweisen und daß die Lokalität der Stichwunde, die Menge des einverleibten Giftes, die Jahreszeit[2]) und andere Umstände eine Rolle spielen können.

Der Stich des in ganz Südeuropa vorkommenden **Scorpio europaeus** scheint beim Menschen nur Schmerz, Rötung und Schwellung, also nur lokale Erscheinungen zur Folge zu haben, während der bedeutend größere, eine Länge bis zu $8^1/_2$ *cm* erreichende, ebenfalls in Südeuropa, aber weniger häufig vorkommende **Scorpio occitanus** durch seinen Stich äußerst heftige Schmerzen, phlegmonöse Schwellung der ganzen betroffenen Extremität und außerdem entferntere Wirkungen: Erbrechen, Ohnmacht, Muskelzittern und Krämpfe hervorrufen kann.[3])

---

[1]) Sur l'appareil venimeux et le venin du Scorpion. Archiv de Zoologie exp. T. **1**. p. 733 (1884) und Compt. rend. T. **95**. p. 866 (1882).

[2]) *G. Sanarelli,* Über Blutkörperchenveränderungen bei Skorpionenstich. Zentralblatt f. klin. Med. Bd. **10**. S. 153 (1889).

[3]) *Jousset de Bellesme,* Essai sur le venin du scorpion. Annal. des sciences natur. Zool. (5.) T. **19**. p. 15 (1874).

Tödlich verlaufene Vergiftungen von Menschen durch Skorpionenstiche sind in der Literatur in ziemlicher Anzahl beschrieben, doch handelt es sich in diesen Fällen um die großen, in tropischen Ländern einheimischen Skorpionenarten. *Guyon*[1]) berichtet über sechs innerhalb 12 Stunden tödlich verlaufene Fälle, und *Cavaroz*[2]) gibt an, daß in der Gegend von Durango in Mexiko jährlich etwa 200 Menschen infolge von Skorpionenstich zugrunde gehen. Dieser Autor sah dort 3 Fälle mit tödlichem Ausgang, wovon zwei Erwachsene betrafen.

Dalange[3]) berichtet über drei in Tunis an Kindern beobachtete Fälle von Vergiftungen durch **Androctonus funestus** und **A. occitanus**. Zwei dieser Kinder starben innerhalb 6 Stunden, das dritte Kind blieb am Leben.

Die Symptome der schweren, durch die großen tropischen Skorpione verursachten Vergiftungen bestehen in heftigen Lokalerscheinungen und nach der Resorption des Giftes in Trismus, schmerzhafter Steifheit des Halses, welche sich bald auch auf die Muskeln des Thorax fortpflanzt und schließlich in allgemeinen tetanischen Krämpfen, unter welchen, anscheinend durch Respirationsstillstand, der Tod erfolgt.

Aus dem 19. Jahrhundert liegen Untersuchungen vor von *Bert*[4]), *Valentin*[5]), *Joyeux-Laffuie*[6]), denen zufolge das Gift seine **Wirkungen** nach Art des Strychnins auf das **Nervensystem** entfaltet, während *Jousset de Bellesme*[7]) und *Sanarelli*[8]) in demselben ein **Blutgift** erblicken wollen.

Die Wirkungen des Skorpionengiftes auf das Blut beobachtete *Jousset de Bellesme* an Lilla viridis, einer durch Pigmentarmut ausgezeichneten und deshalb zu diesen Experimenten besonders geeigneten Froschart. Die Haut der durch den Skorpionenstich verletzten Extremität färbte sich bald rotviolett; diese Färbung, welche nach genanntem Autor auf kapillare Hyperämie zurückzuführen ist, dehnte sich dann bald über den ganzen Rumpf aus. In den oberflächlichen Gefäßen schien das Blut geronnen, während an gewissen Schleimhäuten Ecchymosen auftraten, woraus man vielleicht auf eine Veränderung in den Wandungen der Kapillaren schließen darf. Die roten Blutkörperchen werden durch das Gift

---

[1]) *Guyon*, Du danger pour l'homme de la piqûre du grand scorpion du nord de l'Afrique (Androctonus funestus). Compt. rend. T. **59**. p. 533 (1864). Sur un phénomène produit par la piqûre du scorpion. Compt. rend. T. **64**. p. 1000 (1867). Vgl. auch Compt. rend. T. **60**. p. 16 (1865).

[2]) *M. Cavaroz*, Du scorpion de Durango et du Cerro de los remedios. Recueil de Mémoires de Médecine militaire. (3.) T. **13**. p. 327 (1865).

[3]) *Dalange*, Des piqûres par les scorpions d'Afrique. Mémoires de Médecine militaire. Nr. 6 (1866). *Guyon*, Compt. rend. (1864.)

[4]) *P. Bert*, Venin du scorpion. Compt. rend. Soc. Biol. 1865 und Gaz. méd. de Paris. p. 770 (1865); Compt. rend. Soc. Biol. p. 574 (1885).

[5]) *G. Valentin*, Einige Erfahrungen über die Giftwirkung des nordafrikanischen Skorpions. Zeitschr. f. Biol. Bd. **12**. S. 170 (1876).

[6]) loc. cit.

[7]) loc. cit.

[8]) loc. cit.

in der Weise beeinflußt, daß sie zunächst ihre Form und Konsistenz ändern, klebrig werden und infolge der Bildung einer formlosen, viskösen Masse die Gefäße verstopfen (Embolie).

Sanarelli konnte bei Säugetieren keine derartige Veränderung der Erythrozyten beobachten; an den gekernten roten Blutkörperchen von Amphibien, Fischen und Vögeln trat die hämolytische Wirkung deutlich hervor.

Über die für verschiedene Tiere tödlichen Mengen des Skorpionengiftes stellten *P. Bert*, *Calmette*[1]), *Phisalix* und *Varigny*[2]), *Joyeux-Laffuie* Versuche an.

Calmette fand, daß 0·05 *mg* Trockenrückstand des Giftsekretes von **Scorpio (Buthus) afer** weiße Mäuse, 0·5 *mg* Kaninchen unter ähnlichen Erscheinungen wie „Schlangengift" töteten.

Phisalix und *Varigny* sammelten die auf elektrische Reizung in Tropfenform am Stachel austretende visköse Flüssigkeit auf einem Uhrglas, ließen das so gewonnene Sekret im Vakuumexsikkator eintrocknen und bestimmten den Trockenrückstand, von welchem 0·1 *mg* ein Meerschweinchen tötete.

Die oben geschilderten Erscheinungen treten nur nach subkutaner oder intravenöser Einverleibung des Giftes ein. Bei der Einverleibung per os scheinen keinerlei Wirkungen zu erfolgen.

Die Skorpione besitzen eine hochgradige, aber nicht absolute Immunität gegen ihr eigenes Gift (*Bourne*[3]).

Die Möglichkeit einer Gewöhnung an das Skorpionengift oder einer Immunisierung gegen dasselbe ist bisher an Tieren noch nicht experimentell geprüft worden, doch ist hier der Angabe von *Calmette*[4]) zu gedenken, daß das Serum eines gegen Kobragift immunisierten Kaninchens die Wirkungen von Skorpionengift zu neutralisieren vermag.

Gegen Viperngift immunisierte Meerschweinchen vertrugen 1—2 *mg* Skorpionengift, von welchem sonst 0·1 *mg* diese Tiere tötete.

b) Ordnung Araneina.

Der Giftapparat der echten Spinnen besteht aus der oberhalb des starken, kräftig entwickelten Basalgliedes der Chelizeren (klauenförmige Mandibeln, Kieferfühler) oder in demselben liegenden, länglichen und von Muskeln umgebenen **Giftdrüse** und deren Ausführungsgang, welcher sowohl das Basalglied als auch das klauenförmige, zum Verwunden dienende, aber viel kleinere Endglied durchsetzt und in einer länglichen Spalte an dessen Spitze mündet.

[1]) *Calmette*, Contributions à l'étude des venins etc. Annal. de l'Institut Pasteur. T. 9. p. 232 (1895).

[2]) *C. Phisalix* et *H. de Varigny*, Recherches exp. sur le venin du scorpion. Bull. du Muséum d'Histoire Natur. T. 2. p. 67—73. Paris 1896.

[3]) *A. G. Bourne*, Scorpion virus. Nature. Vol. 36. p. 53 (1887). The reputed suicide of Scorpions. Proc. roy. Soc. Vol. 42. p. 17—22 (1887).

[4]) *Calmette*, loc. cit.

Das Sekret der Giftdrüse, das **Spinnengift**, ist eine klare, ölige Flüssigkeit, reagiert sauer und schmeckt stark bitter. Wie bei den Schlangen wird der Giftvorrat durch wiederholte, rasch aufeinander folgende Bisse bald erschöpft. Die Einverleibung des giftigen Sekretes erfolgt beim Beißen in die durch die Chelizeren gemachte Wunde.

Die chemischen Eigenschaften und die Natur der wirksamen Bestandteile des Spinnengiftes sind unbekannt. Das wirksame Prinzip soll weder ein Alkaloid, noch ein Glykosid, noch eine Säure sein. Es dialysiert nicht und wird beim Eintrocknen unwirksam. Das Sekret der Giftdrüsen und die wirksamen wässerigen Extrakte aus den in Betracht kommenden Körperteilen der Spinnen lassen die Gegenwart von Eiweiß oder eiweißartigen Stoffen durch die bekannten Farben- und Fällungsreaktionen erkennen. Man nimmt daher an, daß es sich hier um die Wirkungen eines Toxalbumins oder eines giftigen Enzyms handle (*Kobert*[1]).

Die wichtigsten und bekanntesten Giftspinnen sind:

Nemesia caementaria Latr., die Minier- oder Tapezierspinne.

Theraphosa avicularia Linn. s. Avicularia vestiaria de Geer., die Vogelspinne.

Theraphosa Blondii Latr., die Buschspinne.

Theraphosa Javanensis Walck.

Die drei genannten Spinnenarten sind stark behaart und haben ihrer Körpergröße entsprechend große Giftapparate und daher auch einen größeren Giftvorrat. Es ist nicht bekannt, ob das Gift auch quantitativ wirksamer ist als das der anderen Giftspinnen. Sie sollen selbst kleine Warmblüter überfallen und töten. Sie gehören zur Gruppe der sogenannten „Mygalidae“, Riesenspinnen oder Würgspinnen und finden sich nur in tropischen Ländern. *Cremer*[2]) berichtet über tödlich verlaufene Bisse bei vier Mitgliedern einer Familie.

Chiracanthium nutrix Walck.

Theridium tredecim guttatum F. s. Lathrodectes tredecim guttatus, die Malmignatte, deren Biß bei 12% der gebissenen Rinder den Tod *(Szczesnowicz)* verursacht.

Theridium lugubre Koch s. Lathrodectes lugubris, L. Erebus[3]), die Karakurte. Das Gift ist nicht allein in der Giftdrüse vorhanden; es findet sich in den verschiedenen Körperteilen der Spinne und konnte auch in den Eiern nachgewiesen werden. Es diffundiert nicht und wirkt nur bei subkutaner oder intravenöser Einverleibung.

Lycosa Tarantula L. s. Tarantula Apuliae Rossi, die süditalienische Tarantel. Ihr Biß ist wenig gefährlich und verursacht nur lokale Erscheinungen an der Bißstelle, niemals aber Allgemein-

[1]) *R. Kobert*, Beiträge zur Kenntnis der Giftspinnen. Stuttgart 1901.

[2]) *Schmidts* Jahrbücher. Bd. **225**. S. 239. Siehe auch Bd. **146**. S. 238.

[3]) Vgl. hierzu *Thorell*, Remarks on Synonyms of European Spiders. p. 509. London 1870—73.

erscheinungen, die auf resorptive Wirkungen zurückgeführt werden könnten.

Lycosa singoriensis Laxmann s. Trochosa singoriensis, die russische Tarantel. Bei subkutaner und intravenöser Injektion der durch Extraktion dieser Spinnen mit physiologischer Kochsalzlösung oder Alkohol gewonnenen Auszüge ließen sich an Katzen keinerlei Erscheinungen wahrnehmen *(Kobert)*.

Epeira diadema Walck., die gewöhnliche Kreuzspinne.

Die Giftigkeit der Kreuzspinne ist vielfach bezweifelt worden, neuerdings aber von *Kobert*, welcher mit wässerigen Auszügen dieser Spinne an Tieren experimentierte, bestätigt worden. Die Wirkungen des Giftes sind denjenigen des Karakurtengiftes ähnlich: letzteres wirkt jedoch stärker als das Kreuzspinnengift. Dieses findet sich auch in den Eiern der Spinne. Die in einer einzigen weiblichen Kreuzspinne enthaltene Giftmenge soll genügen, um 1000 Katzen zu vergiften (*Kobert*, loc. cit. S. 184).

Nachweis und pharmakologische Wirkungen der Spinnengifte.

Die nach dem Bisse giftiger Spinnen beobachteten Erscheinungen sind bedingt durch lokale und resorptive Wirkungen.

Die lokalen Wirkungen bestehen in mehr oder weniger heftiger Schmerzempfindung, Rötung und Schwellung der Bißstelle und deren Umgebung, erstrecken sich aber auch in manchen Fällen auf das ganze betroffene Glied.

Die resorptiven Wirkungen des Spinnengiftes, welche nur nach subkutaner und intravenöser Injektion, nicht aber nach der Einverleibung per os zustande kommen, betreffen das Zentralnervensystem, die Kreislauforgane und das Blut. Nach den an verschiedenen Tierarten mit dem Gifte der Karakurte in großer Zahl ausgeführten Versuchen scheint das Gift dieser Spinne, welches in Ermangelung mit den Giften anderer Spinnenarten ausgeführter Untersuchungen vorläufig als Prototyp für die Wirkungen der Spinnengifte im allgemeinen gelten muß, mancherlei Ähnlichkeiten mit den Wirkungen des Ricins und Abrins zu zeigen *(Kobert)*.

Die Wirkungen des Karakurtengiftes auf das Blut (Hund) äußern sich in der Auflösung der roten Blutkörperchen und dem Austritt des Hämoglobins aus den letzteren (Hämolyse). Diese Wirkung tritt noch bei einer Verdünnung des Giftes von 1:127.000 ein.

In wässerigen Auszügen von Kreuzspinnen findet sich nach *Sachs* eine „Arachnolysin" genannte Substanz, welche ebenfalls die Erythrocyten bestimmter Tierarten (Mensch, Kaninchen, Ochs, Maus, Gans) zu lösen vermag[1], während die roten Blutkörperchen anderer Tiere (Pferd, Hund, Hammel, Meerschweinchen) nicht angegriffen werden.

[1]) *Sachs*, Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. *Hofmeisters* Beiträge zur chemischen Physiologie usw. Bd. 2. S. 125 (1902).

Außerdem steigert dasselbe, wenigstens außerhalb des Organismus im Reagenzglasversuche, die Gerinnbarkeit des Blutes (Pferd). Diese letztere Wirkung, welche noch bei einer Konzentration von 1:60.000 eintritt, kommt vielleicht auch im Organismus des lebenden Tieres zustande und ist dann für die bei manchen Tierversuchen, aber nicht regelmäßig beobachtete intravaskuläre Gerinnung des Blutes verantwortlich. Diese würde ungezwungen das Zustandekommen der ebenfalls nicht regelmäßig beobachteten Konvulsionen erklären (vgl. die Versuchsprotokolle *Koberts*).

Die Konvulsionen wären dann als Erstickungskrämpfe zu deuten, bedingt durch das Darniederliegen der Zirkulation. Diese Annahme findet eine Stütze in der von *Kobert* gemachten Erfahrung, daß künstliche Respiration den letalen Ausgang nicht hinauszuschieben oder zu verhindern vermag. Der Grad der gerinnungsbefördernden Wirkung im Organismus ist vielleicht abhängig von der Menge des einverleibten oder resorbierten Giftes (vgl. unter Schlangengift, Pseudechis porphyriacus, S. 841).

Auf das isolierte **Froschherz** wirkt das Karakurtengift lähmend; diese Wirkung tritt noch bei einer Verdünnung des Giftes von 1:100.000 ein. Die Ursachen der Herzlähmung sind entweder in der Lähmung der motorischen Ganglien dieses Organes oder in einer direkten Wirkung auf den Herzmuskel, vielleicht in beiden der genannten Wirkungen zu suchen. Die Folgen der letzteren äußern sich in dem Sinken des Blutdruckes. Seitens des Gefäßsystems scheinen besonders die kleinsten Arterien und die Kapillaren von der Wirkung des Giftes in der Weise betroffen zu werden, daß die Wandungen derselben Veränderungen erleiden und infolgedessen das Blut bzw. Serum durchlassen. Daher treten punktförmige und zirkumskripte **Blutungen** und Ödeme auf. Am häufigsten und am besten sind diese Ödeme in dem lockeren Lungengewebe zu erkennen; man findet deshalb bei der Sektion die Lunge häufig mit lufthaltiger, schaumiger und manchmal blutiger Flüssigkeit infiltriert. Auch im Magen und im Darme treten derartige Erscheinungen auf, wo sie in der Regel an der Schwellung und Rötung der Schleimhaut zu erkennen sind; manchmal kommt es auch hier zum Blutaustritt. Thrombosierung der Gefäße kann dabei wohl auch eine Rolle spielen, doch würde die Verstopfung der Gefäße allein kaum die Blutextravasate usw. erklären können.

Die Wirkungen des Karakurtengiftes auf das Zentralnervensystem äußern sich in Lähmungserscheinungen, über deren Ursachen vorläufig ein sicheres Urteil nicht gefällt werden kann. Vielleicht handelt es sich um eine direkte lähmende Wirkung, doch ist zu berücksichtigen, daß die oben geschilderten Kreislaufstörungen ähnliche Erscheinungen seitens des Zentralnervensystems bewirken könnten. Insbesondere findet in dieser Annahme das Auftreten von Krämpfen eine befriedigende Erklärung, nachdem doch eine erregende Wirkung des Giftes auf das Zentralnervensystem nicht beobachtet wurde.

Die **tödlichen Mengen des Giftes** sind bei seiner Injektion in das Blut äußerst kleine. Katzen sterben schon nach intravenöser

Einverleibung von 0·20—0·35 *mg* organischer Trockenrückstände wässeriger Spinnenauszüge pro Kilogramm Körpergewicht; Hunde scheinen weniger empfindlich zu sein. Der Igel ist auch diesem Gifte gegenüber resistenter als andere Tiere. Frösche werden erst durch die 50fache Menge der für Warmblüter pro Kilogramm letalen Menge getötet.

Durch wiederholte Einverleibung nicht tödlicher Mengen kann angeblich Gewöhnung an das Spinnengift eintreten.

Über die am Menschen nach dem Bisse giftiger Spinnen, insbesondere der Lathrodectesarten beobachteten Symptome hat *Kobert* in seiner Monographie Berichte aus Asien, Australien und Europa zusammengestellt. Die an zahlreichen Orten am Menschen gemachten Beobachtungen stimmen im wesentlichen mit den Versuchen an Tieren überein. Die Symptome dieser Vergiftung beim Menschen bestehen in heftigen Schmerzen, zu welchen sich auch Rötung und Schwellung (Lymphangitis und Lymphadenitis) gesellen kann. Die Schmerzen sind nicht auf die Bißstelle und das betroffene Glied beschränkt. Erbrechen, Angstgefühl, Dyspnoe und Beklemmung, Ohnmachtsanfälle, Parästhesien, Paresen und zuweilen auch Krämpfe sind die am häufigsten beobachteten Erscheinungen. Die völlige Rekonvaleszenz erfolgt in manchen Fällen nur langsam, wobei große Mattigkeit und Abgeschlagenheit noch lange Zeit bestehen können.

c) Acarina, Milben.

Die Mundteile sind mit gewissen Vorrichtungen ausgestattet, mit welchen die Tiere beißen, stechen oder saugen können.

Über das Gift der Milben und dessen Natur ist nichts bekannt. Die immerhin nicht geringfügigen und lange dauernden Erscheinungen nach ihrem Bisse machen die Anwesenheit eines reizenden Stoffes, welcher beim Biß oder Stich in die Wunde gelangt, sehr wahrscheinlich.

2. Klasse. Myriapoda, Tausendfüßer.

a) Ordnung Chilopoda.

Die der Ordnung der Chilopoden angehörigen Myriapoden sind mit einem Giftapparate ausgestattet, dessen sie sich zum Erlangen ihrer Beute bedienen. Die Beute wird durch Biß getötet. Spinnen und Käfer sind gegen den Biß der Myriapoden sehr empfindlich, Skorpione scheinen der Wirkung des Giftes nur schwer, die Myriapoden selbst derselben kaum zu erliegen.

Der **Giftapparat**[1]) der Scolopendra besteht aus einer zylindrischen, sich nach vorn verschmälernden **Giftdrüse** und ihrem Ausführungsgange, welcher an der Spitze des Kieferfußes in einer kleinen

[1]) *O. Dubosq*, La glande venimeuse de la Scolopendre. Thèse de Paris (1894). Compt. rend. T. **119**, p. 355 (1895). Arch. de Zool. expérim. (3.) T. **4**. p. 575. Les glandes ventrales et la glande venimeuse de Chaetochelynx vesuviana. Vgl. Zool. Zentralbl. Bd. 3. S. 280. Recherches sur les Chilopodes. Arch. de Zool. expérim. T. **6**. p. 535 (1899).

Öffnung mündet. Der ganze Giftapparat liegt innerhalb der Kieferfüße, welche umgebildete oder modifizierte Brustbeine (erstes Paar) darstellen.

Die chemische Natur des Sekretes der Giftdrüse und der wirksamen Bestandteile dieses Sekretes ist unbekannt.

Beim Menschen verursacht der Biß einheimischer Scolopendren nur lokale Erscheinungen. Es bildet sich meistens nur eine kleine Quaddel an der Bißstelle, doch soll im Sommer der Biß oft Entzündungen von erysipelartigem Charakter verursachen, so daß die zunächst an der Bißstelle auftretende Schwellung und Rötung sich über die ganze betroffene Extremität verbreiten kann. Allgemeine Erscheinungen treten nie auf *(Dubosq)*. Eine in Indien einheimische Art, welche eine Länge von 2 Fuß erreichen soll, tödet angeblich durch ihren Biß auch Menschen.[1]) Mäuse und Murmeltiere werden durch den Biß von Scolopendren gelähmt und gehen an den Wirkungen des Giftes zugrunde (*Jourdain*[2]).

b) Ordnung Chilognatha s. Diplopoda.

Eine Anzahl der Ordnung der Chilognathen angehörige Myriapoden besitzen in dem Sekrete gewisser Hautdrüsen Schutzmittel gegen Feinde. Diese Sekrete enthalten flüchtige, zum Teil unangenehm riechende, manchmal auch ätzende Stoffe und werden durch Poren, sogenannte „Foramina repugnatoria"[3]), welche auf beiden Seiten des Rückens liegen, nach außen entleert.

Über die chemische Natur derartiger von Myriapoden ausgeschiedener, flüchtiger Stoffe liegen in der Literatur mehrere Angaben vor, nach welchen es sich bei Fontaria gracilis[4]) und Fontaria virginica[5]) um einen in Benzaldehyd und Blausäure spaltbaren Körper, bei Julus terrestris[6]) um Chinon und bei Polyzonium rosalbum[7]) um einen nach Kampfer riechenden Stoff handeln soll. Spirostrephon lactarima sezerniert ein milchiges, sehr übelriechendes Sekret.

Ein besonderes Interesse beansprucht die Angabe, daß gewisse in den Tropen einheimische Geophilusarten in bestimmten, an der Bauchfläche gelegenen Drüsen ein zu einer viskösen Masse erstarrendes Sekret

[1]) *O. v. Linstow,* Die Gifttiere. S. 111. Berlin 1894.

[2]) *S. Jourdain,* Le venin des Scolopendres. Compt. rend. T. **131**. p. 1007 (1900).

[3]) *M. Weber,* Über eine Cyanwasserstoff bereitende Drüse. Archiv f. mikr. Anatomie. Bd. **21**. S. 468—475 (1882).

[4]) *C. Guldensteeden-Egeling,* Über die Bildung von Cyanwasserstoffsäure bei einem Myriapoden. *Pflügers* Archiv. Bd. **28**. S. 576 (1882).

[5]) *E. D. Cope,* A Myriapod, which produces Prussic Acid. Amer. Naturalist. Vol. **17**. p. 337 (1883). — *E. Haase,* Eine Blausäure produzierende Myriapodenart, Paradesmus gracilis. Sitzungsber. d. Ges. naturforsch. Freunde. S. 97 (1889).

[6]) *C. Phisalix,* Un venin volatil, secretion cutanée du Julus terrestris. Compt. rend. T. **131**. p. 955 (1900). — *Béhal* und *Phisalix,* La quinone, principe actif du venin du Julus terrestris. Compt. rend. T. **131**, p. 1004 (1900).

[7]) *O. F. Cook,* Camphor secreted by an animal (Polyzonium). Science, N. S. Vol. 12. p. 516 (1900).

bereiten, welches prachtvoll phosphoresziert, und die Tiere daher bei ihren Bewegungen einen Lichtstreifen nach sich zu ziehen scheinen.[1])

3. Klasse. Hexapoda, Insekten.

a) Ordnung Hymenoptera, Hautflügler.

Unterordnung Aculeata, Stech-Immen.

Familie Apidae, Bienen.

Aculeaten nennt man diejenigen Hymenopteren (Hautflügler), welche mit einem Stachel (Aculeus) versehen sind und mittelst dieses Stachels Stichwunden verursachen können. Gleichzeitig mit dem Stich erfolgt auch eine Entleerung giftiger Flüssigkeit in die Wunde.

Über die anatomischen Verhältnisse des Stachelapparates, auf welche hier nicht eingegangen werden kann, finden sich ausführliche Angaben bei *Sollmann,* Zeitschr. f. wissenschaftl. Zoologie. S. 528 (1863) und bei *Kraepelin,* ebenda. S. 289 (1873).

Über die chemischen Eigenschaften des Bienengiftes liegen Untersuchungen von *Brandt* und *Ratzeburg*[2]), von *Paul Bert*[3]), dessen Angaben sich auf das Gift der Holzbiene (Xylocopa violacea) beziehen, und von *Carlet*[4]) vor.

Den eingehenden und sorgfältigst ausgeführten Untersuchungen von *Josef Langer*[5]) verdanken wir aber in erster Linie unsere Kenntnisse über die chemische Natur und die pharmakologischen Wirkungen des Giftes unserer Honigbiene. *Langer* sammelte das Gift der Bienen (im ganzen von etwa 25.000 Stück) in der Weise, daß er das dem Bienenstachel entquellende Gifttröpfchen in Wasser brachte, oder aber, was eine bessere Ausnutzung des Materials gestattete, die dem Bienenkörper frisch entnommenen, mit einer Pinzette herausgerissenen Stachel samt Giftblasen in Alkohol von 96% brachte, in welchem sich der wirksame Bestandteil des Sekretes der Giftdrüse nicht löst. Seine Löslichkeit in Wasser erleidet durch die Alkoholbehandlung keine Veränderung und die charakteristischen Eigenschaften bleiben vollkommen erhalten.

Der in Alkohol unlösliche Rückstand wurde bei 40° getrocknet, zu einem feinen Pulver verrieben und dann mit Wasser ausgezogen. Der filtrierte wässerige Auszug stellte eine klare, gelblich braune Flüssigkeit dar, welche die für das ganze Giftsekret charakteristischen Wirkungen zeigte. Die Wirksamkeit solcher wässerigen Lösungen des Bienengiftes wird durch zweistündiges Erhitzen auf 100° nicht vermindert.

Das frisch entleerte Gifttröpfchen, dessen Gewicht zwischen 0·2 bis 0·3 *mg* schwankt, ist wasserklar, reagiert deutlich sauer, schmeckt bitter

---

[1]) *O. F. Cook,* a. a. O.

[2]) Medizinische Zoologie. Bd. 2. S. 198 (1833).

[3]) Gazette médicale de Paris. p. 771 (1865).

[4]) Compt. rend. T. 98. p. 1550 (1884).

[5]) Archiv f. exp. Pathologie. Bd. **38**. S. 381 (1897).

und besitzt einen eigenartigen, aromatischen Geruch; sein spezifisches Gewicht ist 1·1313. Beim Eintrocknen bei Zimmertemperatur hinterläßt das native Bienengift etwa 30% Trockenrückstand.

Die saure Reaktion des nativen Giftes ist wahrscheinlich durch Ameisensäure bedingt, welche aber für die Wirkungen des Giftsekretes nicht in Betracht kommt (vergl. *Langer*, a. a. O. S. 387). Letzteres gilt auch für den flüchtigen Körper, welcher den fein aromatischen Geruch des Giftsekretes bedingt und beim Öffnen einer gut bevölkerten Bienenwohnung wahrgenommen wird.

Zur **Darstellung des giftigen Bestandteiles** des Sekretes sammelte *Langer* 12,000 Stachel samt Giftblasen in Alkohol von 96%; vom Alkohol wurde abfiltriert, die Stachel bei 40° getrocknet und zu einem Pulver zerrieben, letzteres sodann mit Wasser extrahiert. Der klare, bräunlich gefärbte, filtrierte, wässerige Auszug wurde durch Eintropfenlassen in Alkohol von 96% gefällt, der Niederschlag gesammelt, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen. Nach dem Verdunsten des Äthers hinterblieb eine grauweiße Substanz in Lamellen, welche noch Biuretreaktion zeigte. Zur weiteren Reinigung dieses Produktes wurde dasselbe in möglichst wenig reinem oder schwach essigsäurehaltigem Wasser gelöst und durch Zusatz von einigen Tropfen konzentrierten Ammoniaks die wirksame Substanz nach mehrmaligem Lösen und Fällen **in eiweißfreiem Zustande** erhalten. Die charakteristischen Wirkungen des ganzen Sekretes waren dieser aschefreien Substanz eigen. Die schwach essigsaure Lösung dieses Körpers zeigte keine der bekannten Eiweißreaktionen. Mit einer Reihe von Alkaloidreagenzien dagegen gab dieselbe Fällungen. Man ist daher wohl berechtigt, die wirksame Substanz des Bienengiftes als eine organische Base anzusprechen. Die nähere chemische Charakterisierung der Base steht infolge der Schwierigkeiten der Beschaffung des zu diesem Zwecke erforderlichen Materials noch aus.

Das Bienengift wird zerstört oder seine Wirksamkeit vermindert durch gewisse oxydierende Agenzien, insbesondere durch Kaliumpermanganat, aber auch durch Chlor und Brom und ferner durch die Einwirkung von Pepsin, Pankreatin und Labferment.[1])

Die **pharmakologischen Wirkungen des Bienengiftes** charakterisieren sich als heftig schmerz- und entzündungserregend. Außerdem verursacht es an der Injektionsstelle und deren Umgebung lokale Gewebsnekrose. In der Umgebung des nekrotischen Herdes entwickeln sich Hyperämie und Ödem. Am Kaninchenauge bewirkten 0·04 *mg* des nativen Giftes, auf die Konjunktiva appliziert, Hyperämie, Chemosis und darauf eitrige oder kruppöse Konjunktivitis. Auf die unversehrte Haut appliziert, ist das native Bienengift sowie auch eine 2%ige Giftlösung ohne jede Wirkung. Die Schleimhäute der Nase und des Auges reagieren dagegen in spezifischer Weise.

---

[1]) *J. Langer*, Abschwächung und Zerstörung des Bienengiftes. Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie. T. **6**. p. 181—194 (1899).

Bei der intravenösen Applikation von 6 *cm*³ einer 1·5⁰/₀igen Giftlösung (auf natives Gift berechnet) an einem 4·5 *kg* schweren Hunde erfolgten bald klonische Zuckungen, die sich sehr rasch zu wiederholten Anfällen von allgemeinen klonischen Zuckungen mit Trismus, Nystagmus und Emprosthotonus steigerten. Das Tier ging unter Respirationsstillstand zugrunde.

Bei der Wirkung am Hunde verdient die Blutkörperchen lösende Eigenschaft des Bienengiftes im Organismus hervorgehoben zu werden. Im mikroskopischen Blutpräparate fanden sich nur wenige intakt erhaltene Erythrocyten: das lackfarbene Blut enthielt sehr viel gelöstes Hämoglobin und zeigte, spektroskopisch untersucht, die Anwesenheit von Methämoglobin. Die Sektionsbefunde an dem betreffenden Versuchstiere ließen in allen Organen, mit Ausnahme der Milz, starke Hyperämie und Hämorrhagien erkennen.

Pharmakologisch ist das Bienengift vorläufig in die Gruppe der diffusiblen, Nekrose erzeugenden, nicht flüchtigen Reizstoffe einzureihen, deren Hauptrepräsentant das Cantharidin ist.

Von hohem wissenschaftlichen Interesse und von praktischer Bedeutung ist die den Imkern schon lange bekannte und von *Langer*[1]) genauer studierte Möglichkeit der Gewöhnung an das Bienengift.

Die Immunität gegen das Bienengift scheint niemals eine absolute zu werden. Die Möglichkeit der Immunisierung gegen das in minimalen Mengen wirksame Bienengift ist von wissenschaftlicher Bedeutung, weil es sich hier um eine, wenigstens bis zu einem gewissen Grade, chemisch charakterisierte Substanz handelt, die jedenfalls kein Eiweißkörper, kein sogenanntes „Toxalbumin" ist. Sollte es gelingen, ein gegen die Wirkungen des Bienengiftes aktives „Antiserum" zu gewinnen, so wäre damit der Beweis erbracht, daß auch gegen chemisch definierbare Körper eine sogenannte „Antitoxinbildung" möglich ist.

Der von den Bienen bereitete **Honig** besitzt zuweilen giftige Eigenschaften, welche zu gefährlicher Erkrankung, manchmal sogar zu Todesfällen Veranlassung geben können. Das Vorkommen giftigen Honigs kann keinem Zweifel unterliegen.

W. J. Hamilton[2]) hat die Erzählung *Xenophons* von der Giftwirkung des Honigs zu Trapezunt durch Untersuchungen an Ort und Stelle bestätigt. *Barton*[3]) teilte 1790 viele Fälle von Vergiftungen durch Honig in Pennsylvanien und Florida mit. In Brasilien ist die Vespa Lecheguana wegen ihres giftigen Honigs berüchtigt. In Altdorf in der Schweiz starben (1817) zwei Hirten durch den Genuß des Honigs von Bombus terrestris.

---

[1]) *J. Langer*, Bienengift und Bienenstich. Bienenvater. Jg. 33. Nr. 10. S. 190—195 (1901). — Derselbe, Der Aculeatenstich. Festschrift für *F. J. Pick* (1898).

[2]) Reise in Kleinasien usw. Deutsch von *Schomburgh*. Leipzig 1843.

[3]) *Th.* und *H. Husemann*, Handbuch der Toxikologie. S. 274. Berlin 1862.

Nach *Auben*[1]) sind in Neu-Seeland, hauptsächlich unter den Maoris, Vergiftungsfälle durch wilden Honig nicht selten. Bei schweren Fällen tritt der Tod schon nach 24 Stunden ein.[2])

Der Grund für die Giftigkeit liegt in dem Umstande, daß die Bienen aus den Blüten gewisser Pflanzen giftige Pflanzenstoffe aufnehmen.

Von solchen Giftpflanzen, deren Giftstoffe durch die Bienen in den Honig übergehen können, sind besonders solche aus den Familien der Apocyneae, Ericaceae[3]), Ranunculaceae zu nennen.

Familie Formicidae, Ameisen.

Die nach dem Bisse einheimischer Ameisen auftretenden lokalen Erscheinungen sind sehr unbedeutende. An der Bißstelle pflegt sich nur eine geringfügige Entzündung und höchstens Quaddelbildung zu entwickeln.

Die durch gewisse tropische Ameisen verursachten Verletzungen sind dagegen ernsterer Natur und können Allgemeinerscheinungen, Ohnmacht, Schüttelfrost und vorübergehende Lähmungen verursachen (*Husemann*[4]).

Manche Arten von Ameisen (Myrmica, Ponera) haben einen dem Giftapparat der Bienen analogen Stechapparat, d. h. sie besitzen einen mit einer **Giftdrüse** verbundenen **Giftstachel.** Bei anderen Arten liegt die Giftdrüse in der Nähe des Afters; diese spritzen das Sekret der Giftdrüsen in die durch ihren Biß verursachte Wunde, indem sie den Hinterleib nach oben und vorn biegen.

Die morphologischen Verhältnisse des Giftapparates der Ameisen hat *Forel*[5]) eingehend untersucht und beschrieben.

Die chemische Natur des in dem Giftsekret der Ameisen enthaltenen wirksamen Körpers ist nicht mit Sicherheit festgestellt. Man nahm an, daß die in dem Sekrete in großer Menge vorhandene Ameisensäure das giftige Prinzip sei, wie das auch bei dem Gifte der Honigbiene früher geschah. Die schwache, lokal reizende Wirkung des Giftes unserer einheimischen Ameisen könnte allenfalls durch die lokale, ätzende Wirkung der Ameisensäure bedingt sein; für die schwereren, durch gewisse exotische Arten verursachten Erscheinungen kann die Ameisensäure jedoch kaum verantwortlich gemacht werden. Dafür spricht auch die Angabe *Stanleys*, der zufolge gewisse afrikanische Völkerschaften sich des Giftes bestimmter roter Ameisen als Pfeilgift[6]) bedienen. Durch solche Pfeile verursachte Ver-

---

[1]) *Auben*, British Medical Journal. **1** (1905). Zitiert nach *Kühn*.

[2]) *W. Kühn*, Pharmazeutische Zeitung. Bd. **50**. S. 642 (1905).

[3]) Vgl. hierzu *Archangelsky*, Über Rhododendrol, Rhododendrin und Andromedrotoxin. Archiv f. exp. Patholog. Bd. **46**. S. 313 (1901).

[4]) *Th.* und *H. Husemann*, Handbuch der Toxikologie. S. 275—276. Berlin 1862.

[5]) *A. Forel*, Der Giftapparat und die Analdrüsen der Ameisen. Zeitschr. f. wissenschaftliche Zoologie. Bd. **30**. Supplement. S. 28 (1878).

[6]) *H. M. Stanleys* Briefe über Emin Paschas Befreiung. Herausgegeben von *J. Scott Keltie*. Deutsche Übersetzung von *H. v. Wobeser*. 5. Aufl. S. 48. Leipzig 1890.

wundungen sollen rasch den Tod herbeiführen. Es handelt sich wahrscheinlich um die Wirkungen einer noch unbekannten Substanz, welche vielleicht nach Art des in den Brennhaaren der ostindischen Juckbohne[1]) (Negretia pruriens) oder in der Brennnessel[2]) (Urtica dioica) enthaltenen Stoffes wirkt.

b) Ordnung Lepidoptera, Schuppenflügler, Schmetterlinge.

Die Raupen mancher Schmetterlinge sind nach neueren Untersuchungen unzweifelhaft Gifttiere.

Hierher gehören die Raupen von:

Cnethocampa processionea Lin., Eichen-Prozessionsspinner,
Cnethocampa pinivora Tr., Kiefer-Prozessionsspinner, und
Cnethocampa pityocampa Fabr., Pinien-Prozessionsspinner.

Die durch die Prozessionsraupen hervorgerufenen Krankheitserscheinungen sind seit den Untersuchungen von *Réaumur* (1756), welcher diese Tiere und ihre Lebensgewohnheiten zuerst genauer beschrieb, gut bekannt. Sie bestehen nach den übereinstimmenden Angaben von *Réaumur*[3]), *Brockhausen*[4]), *Morren*[5]), *Fabre*[6]) und anderer Autoren in mehr oder weniger heftiger Entzündung und Schwellung, insbesondere der Schleimhäute der Konjunktiva, des Kehlkopfes und des Rachens; doch kann auch die äußere Haut durch das Eindringen der Haare in einen Zustand entzündlicher Reizung (Urticaria) versetzt werden.

Die Frage nach der Ursache der geschilderten Wirkungen der Haare dieser Raupen ist durch die Untersuchungen von *Fabre* entschieden. Nach diesem Autor verursachen die mit Äther sorgfältig extrahierten Haare, die bei dieser Behandlung die Widerhaken nicht verloren, nach der Applikation auf die menschliche Haut keinerlei Erscheinungen, während der nach dem Verdunsten des Äthers zurückbleibende Stoff auf der Haut Schwellung und Bläschenbildung verursachte. Die gleiche Wirkung auf die intakte Haut zeigte auch das Blut dieser Raupen und in weit höherem Grade die Rückstände von Ätherauszügen der Exkremente dieser Tiere.

Fabre dehnte seine Untersuchungen auch auf eine Reihe anderer Lepidopteren aus und fand in dem Harn aller darauf untersuchter Schmetterlinge einen Stoff, welcher auf der Haut heftige Entzündung ver-

---

[1]) *Vogel,* Über Ameisensäure. Sitzungsber. d. Akad. d. Wissenschaften in München. Mathem.-phys. Klasse. Bd. **12**. S. 344—355 (1882).

[2]) *G. Haberlandt,* Zur Anatomie und Physiologie der pflanzlichen Brennhaare. Sitzungsbericht d. Wiener Akademie. (93.) Bd. **1**. S. 130 (1886).

[3]) *Réaumur,* Des chenilles qui vivent en société. Mémoires pour servir à l'Histoire des insectes. T. **2**. p. 179 (1756) *(Morren).*

[4]) *M. B. Brockhausen,* Beschreibung der europäischen Schmetterlinge. Bd. **3**. S. 140 (1790).

[5]) *Ch. Morren,* Observations sur les moeurs de la processionaire et sur les maladies qu'occasionne cet insect malfaisant. Bull. de l'Acad. roy. de Belge. (1.) T. **15**. (2.) p. 132—144 (1848).

[6]) *H. J. Fabre,* Un virus des Insectes. Annal. des sciences nat. (8.) T. **6**. p. 253 à 278 (1898).

ursachte. Demnach ist das Vorkommen eines lokal reizenden und Entzündung erregenden, nach Art des Cantharidins wirkenden Stoffes nicht auf die Prozessionsraupen allein beschränkt, sondern auch bei anderen Lepidopteren erwiesen. Derartig wirkende Stoffwechselprodukte finden sich auch bei anderen Insekten als den darauf untersuchten Lepidopteren und Coleopteren. *Fabre* hat bei einigen Hymenopteren und Orthopteren ebenfalls einen blasenziehenden und sogar Geschwürsbildung verursachenden Stoff nachweisen können.

Es fragt sich aber, warum von den behaarten Raupen die Prozessionsraupen allein die geschilderten Krankheitserscheinungen verursachen. *Fabre* findet die Erklärung für diese Frage in der Lebensweise dieser Tiere, welche sich tagsüber dicht gedrängt in ihren mit Exkrementen stark verunreinigten Nestern aufhalten. Die Exkremente haften an den Haaren der Raupen fest und werden dann mit diesen im Freien zerstäubt, so daß auch ohne direkte Berührung der Tiere der entzündungserregende Stoff auf die äußere Haut und die Schleimhäute gelangt und dort seine Wirkungen entfaltet.

Für das Vorkommen von lokal reizend wirkenden Stoffen auch bei anderen als den von *Fabre* untersuchten Lepidopteren sprechen ferner gewisse, bei den in Seidenfabriken beschäftigten Arbeiterinnen gemachten Erfahrungen. An den Händen der Arbeiterinnen, welche mit dem Abspinnen der in heißem Wasser aufgeweichten Kokons beschäftigt sind, bilden sich häufig Bläschen und Pusteln, wobei es zur Eiterung kommen kann und die Hände stark schmerzen [*Potton*[1]), *Melchiori*[2])]. Vielleicht handelt es sich hier um die Wirkungen eines im Kokon vorhandenen und aus dem Organismus des Seidenspinners (Bombyx mori) oder dessen Raupe stammenden cantharidinartig wirkenden Stoffwechselproduktes.

Zu den aktiv giftigen Lepidopteren sind die Larven der Gattung Cerura Schr. s. Harpyia Ochs. (Gabelschwanz) zu zählen, welche sich (Juni bis August) an Weiden, Pappeln und Linden finden und bei der Berührung aus einer Querspalte des ersten Ringes unter dem Kopfe (Prothorax) eine stark saure, ätzende Flüssigkeit hervorspritzen. Von *Meldola* auf Veranlassung von *Poulton*[3]) ausgeführte Analysen des Sekretes (Dicranura) ergaben einen Gehalt desselben von 33–40% wasserfreier Ameisensäure.

c) Ordnung Coleoptera, Käfer.

Zahlreiche Käferarten besitzen eigenartige Vorrichtungen zur Bereitung und Absonderung von defensiv zu verwendenden Stoffwechselpro-

---

[1]) *Potton*, Recherches et observations sur le mal de vers ou mal de bassine, éruption vesico-pustuleuse qui attaque exclusivement les fileuses de cocons de vers à soie. Annal. d'hygiène. T. **49**. p. 245—255 (1853).

[2]) *G. Melchiori*, Die Krankheiten an den Händen der Seidenspinnerinnen. *Schmidts* Jahrb. Bd. **96**. S. 224—226 (1857).

[3]) *E. B. Poulton*, The secretion of pure aqueous formic acid by Lepidopterous Larvae for the purpose of defence. Brit. Ass. Report. p. 765 (1887). Trans. Entomological Society. London 1886.

dukten. Es kann sich dabei um **Sekrete bestimmter Drüsen** handeln oder aber um Giftstoffe, die im ganzen Organismus der Käfer verbreitet sind. Im ersteren Falle sind es meistens Anal-, Speichel- oder Tegumentdrüsen, die ein spezifisches Sekret von höchst unangenehmem Geruche oder auch von ätzender Wirkung liefern. Im zweiten Falle ist das **Gift im Blute** enthalten.

Das Blut kann an bestimmten Stellen des Körpers, meistens an den Gelenken, an die Oberfläche treten und wirkt dann infolge seines Gehaltes an gewissen Stoffen als Abwehr- oder Verteidigungsmittel.

Virey[1]) beobachtete zuerst, daß der Maiwurm (Meloe majalis) beim Anfassen eine gelbe Flüssigkeit aus den Beingelenken austreten läßt, welche einen „scharfen" Stoff enthält. Dieser Autor machte auch darauf aufmerksam, daß gerade diese Käferart, ebenso wie die Canthariden, bei denen eine ähnliche Erscheinung bekannt ist, zu medizinischen Zwecken als entzündungserregendes und blasenziehendes Mittel verwendet wird.

Leydig[2]) wies dann (1859) an bestimmten Arten von Coccinella, Timarcha und Meloe nach, daß die aus den Gelenkspalten austretende Flüssigkeit dieselben morphologischen Elemente enthält wie das Blut der genannten Käfer, und *Cuénot*[3]) konnte sich davon überzeugen, daß dieser wahrscheinlich reflektorische Blutaustritt, von ihm als „Saignée reflexe" bezeichnet, bei den verschiedensten Chrysomeliden, Coccinelliden und Vesicantien sowie auch bei gewissen Orthopteren (Eugaster und Ephippiger) zu beobachten ist. Auch bei einzelnen Carabiden ist dieser Vorgang beobachtet worden.[4]) Die Art und Weise, wie das Blut aus dem Körper austritt, ist noch nicht mit Sicherheit festgestellt.

Ist man auch über den Mechanismus des Blutaustrittes noch nicht im klaren, so darf man doch wohl kaum daran zweifeln, daß das auf die eine oder die andere Weise an die Körperoberfläche gelangte Blut eine Schutzwirkung gegenüber den Feinden dieser Tiere entfaltet. Die Ergebnisse und Beobachtungen der diese Tatsache begründenden Tierversuche von *Cuénot* und von *Beauregard*[5]) lassen kaum eine andere Deutung zu.

Die chemische Natur der im Blute der genannten Insekten vorkommenden scharfen, entzündungserregenden Stoffe ist mit Ausnahme des im Blute von Lytta vesicatoria L. sich findenden Cantharidins völlig unbekannt. Über das Cantharidin sind wir aber chemisch und pharmakologisch genau unterrichtet.

Das **Cantharidin** wird aus verschiedenen, der Familie der Pflasterkäfer, Vesicantia, angehörenden Lytta-, Mylabris- und Meloearten gewonnen. Von diesen ist Lytta vesicatoria, Spanische Fliege, die bekannteste Art; in getrocknetem Zustande stellt dieser Käfer das offizinelle Präparat „Cantharides" der deutschen Pharmakopöe dar, welches bis in die neueste Zeit als Diuretikum gegen Wassersucht, bei Krankheiten der Harn-

---

[1]) *J. J. Virey,* Bull. de Pharmacie. T. 5. p. 108—109 (1813).

[2]) *Leydig,* Archiv f. Anat. S. 36 (1859).

[3]) *L. Cuénot,* Bull. de la Soc. zoolog. de France. T. 15. p. 126 (1890). Compt. rend. T. 118. p. 875 (1894) und T. 122. p. 328 (1896). Arch. de Zoolog. expér. (3.) T. 4. p. 655 (1896).

[4]) Vgl. Zoolog. Jahresbericht (1895). *(C. E. Porter.)*

[5]) Compt. rend. de la Soc. de Biol. (7.) T. 6. p. 509 (1884). Journ. de l'Anat. et de Physiol. T. 21. p. 483 und T. 22. p. 83—108, 242—284 (1886). Les insectes vesicants. Paris (1890).

und Geschlechtsorgane, gegen Gicht, bei Bronchitis und vielen anderen Krankheiten innerlich angewendet wurde.[1])

Vergiftungen mit Canthariden sind keineswegs selten. In der Statistique criminelle von *Brunet* sind für Frankreich allein für das Jahr 1847 und einige Jahre vorher 20 Giftmorde oder Giftmordversuche mit Canthariden aufgezählt. In einem Falle wurden während eines Monates bald kleinere, bald größere Mengen von Canthariden in Pulverform den Speisen oder Getränken zugesetzt; in einem anderen Falle, der bekannten „Affaire Poirier", war Cantharidenpflaster der Suppe beigemischt worden.[2])

Auch Selbstmorde durch innerlichen Gebrauch des Cantharidenpulvers und des Pflasters sind bekannt. Der Mißbrauch von Canthariden zur Herbeiführung von Abortus hat ebenfalls zur Vergiftung mit tödlichem Ausgange geführt.

Technische Vergiftungen. Bei der Herstellung der verschiedenen pharmazeutischen Cantharidenpräparate kann es leicht zu mehr oder weniger schweren Vergiftungen kommen infolge des Einatmens des beim Zerreiben und Pulvern der Canthariden auftretenden Staubes.

Medizinale Vergiftungen durch Canthariden waren früher häufig.

Das **Cantharidin** ist derjenige Bestandteil der Lytta vesicatoria und verwandter Käferarten, welcher die charakteristischen Wirkungen hervorruft. Dasselbe kristallisiert in trimetrischen Tafeln, deren Schmelzpunkt bei 218° liegt und deren empirische Zusammensetzung der Formel $C_{10}H_{12}O_4$ entspricht. Es ist in Wasser schwer löslich, leichter löslich in Alkohol, Schwefelkohlenstoff, Äther und Benzol, sehr leicht löslich in Chloroform, Essigsäther und in fetten Ölen.

Das Cantharidin hat saure Eigenschaften: aus kohlensauren Alkalien macht es Kohlensäure frei unter Bildung von Alkalisalzen, welche ebenfalls sehr wirksam sind. Durch Säuren wird das Cantharidin aus wässerigen Lösungen seiner Alkalisalze abgeschieden. Nach Untersuchungen von *H. Meyer*[3]) ist das Cantharidin, entgegen früheren Annahmen, nicht ein Säureanhydrid, sondern ein β-Lakton einer Ketonsäure, für welches der genannte Autor die Konstitutionsformel[4])

```
              CH
             / | \
       H2C  /  |  \ C < CH2 — COOH
         |    CH2  |   O
         |      \  |   |
       H2C       \ C — CO
           \      /
            \    /
             CH2
```

aufstellt.

[1]) *Steidel,* Über die innere Anwendung der Canthariden. Eine historische Studie. Dissert. Berlin 1891. — *L. M. v. Galippe,* Étude toxicologique sur l'empoisonnement par la cantharidine et par les préparations cantharidiennes. Paris 1876. — *Kobert,* Hist. Studien. Bd. 4. S. 119. — *R. Forsten,* Disquisitio medica Cantharidum, historiam naturalem, chemicam et medicam exhibens. Straßburg 1776. — *v. Schroff,* Lehrbuch der Pharmakologie. 4. Aufl. S. 398 (1873).

[2]) *Taylor,* Die Gifte. Bd. 2. S. 553 (1863).

[3]) Monatsh. f. Chemie. Bd. 18. S. 393—410 (1897) und Bd. 19. S. 707—726 (1898).

[4]) Über die Konstitution des Cantharidins; vgl. auch *Piccard, Homolka, Anderlini, Spiegel.*

Die Titration ergibt die Anwesenheit von nur einer Karboxylgruppe. Das Cantharidin wird durch kochende Soda-Permanganatlösung nicht verändert, woraus auf einen vollständig hydrierten Kern geschlossen werden kann.

Der Cantharidingehalt der verschiedenen Coleopteren variiert innerhalb ziemlich weiter Grenzen, auch bei derselben Art. *Warner*[1]), *Bluhm*[2]), *Rennard*[3]), *Beauregard*[4]) u. a. haben die Mengen des Cantharidins quantitativ bestimmt.

Der brasilianische Pflasterkäfer, Epicauta adspersa, soll 2·5% Cantharidin und Meloe majalis über 1% enthalten.[5])

Die **Wirkungen des Cantharidins** bei äußerlicher Anwendung charakterisieren sich durch äußerst heftige Entzündungen an der Applikationsstelle. Schon in Mengen von weniger als 0·1 *mg* in Öl gelöst auf die menschliche Haut gebracht, bewirkt es nach einigen Stunden Blasenbildung. Infolge seiner Nichtflüchtigkeit durchdringt das in einem die Hautschmiere lösenden Vehikel auf die Haut gebrachte Cantharidin nur langsam die Epidermis und erzeugt in der Cutis, zunächst aber nicht in den tieferen Schichten, eine exsudative Entzündung, welche zur Bildung von Blasen führt. In ähnlicher Weise wirkt das Cantharidin nach der Resorption, auch in Form seiner Alkalisalze, auf die verschiedensten drüsigen Organe, seröse Höhlen und Schleimhäute, wo es zur Ausscheidung kommt und verursacht da eine entzündliche Reizung. Die Hauptmenge des resorbierten Cantharidins wird durch die Nieren ausgeschieden und deshalb kommt es leicht nach Anwendung von Cantharidenpflastern zu Nierenreizung mit Eiweißausscheidung im Harn und später zur ausgebildeten Nephritis.

Außer den oben beschriebenen Wirkungen des Cantharidins auf die genannten Organe wirkt dasselbe nach seiner Resorption aber auch direkt auf das Zentralnervensystem. Katzen und Hunde erbrechen heftig nach subkutaner Injektion von wenigen Milligramm eines Alkalisalzes des Cantharidins, die Respiration wirkt stark beschleunigt, dann tritt Dyspnoe und durch Respirationsstillstand der Tod ein, welchem heftige Konvulsionen vorausgehen können.

Gewisse Tiere zeigen gegen das Cantharidin eine relative Immunität. Frösche und Hühner sind nach den Untersuchungen von *Radecki*[6]) sehr wenig empfindlich. Gaben von 15—30 *mg* Cantharidin, als Kalium-

[1]) Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharmazie. Bd. **6**. S. 86—89 (1857). Vgl. auch American Journ. of Pharmacy. Vol **28**. p. 193 (1856).

[2]) *C. Bluhm*, Beiträge zur Kenntnis des Cantharidins. Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharmazie. Bd. **15**. S. 361—372 (1866).

[3]) *E. Rennard*, Das wirksame Prinzip im wässerigen Destillate der Canthariden. Inaug.-Diss. Dorpat 1871.

[4]) *H. Beauregard*, Recherches sur les insectes vésicants. Journ. de l'Anat. et de Physiol. T. **21**. p. 483—524 und T. **22**. p. 83—108, 242—284 (1886).

[5]) *Bernatzik-Vogl*, Lehrbuch der Arzneimittellehre. 3. Aufl. S. 542 (1900).

[6]) *Radecki*, Die Cantharidinvergiftung. Inaug.-Diss. Dorpat 1866. — *J. Sussnitzki*, Das Verhalten der Hühner gegen Cantharidin. Inaug.-Diss. Königsberg 1903.

salz subkutan injiziert, verursachen bei Hühnern keinerlei Wirkung; ebenso können Hühner Canthariden und Cantharidin ohne Schaden fressen. Versuche von *Harnack*, *Horvath*, *Lewin* und *Ellinger* [1]) ergaben, daß auch der Igel sehr resistent gegen das Cantharidin ist. Ein Igel von 700 *g* zeigt nach intravenöser Injektion von 20 *mg* keine Nierenstörung. Bei diesem Tiere rufen bei subkutaner Applikation 30—50 *mg* nur eine geringe Nierenschädigung hervor; 100 *mg* verursachen schwere Nephritis und führen nach einigen Tagen zum Tode.

Am Kaninchen bewirkt schon 0·1 *mg* Cantharidin, subkutan injiziert, Nephritis und 1·0 *mg* pro Kilogramm Tier führt den Tod herbei.

Die tödliche Dosis für den Menschen ist nicht mit Sicherheit festgestellt. Die Autoren nehmen dieselbe allgemein zu etwa 0·03 *g* an. Nach den bei der *Liebreich*schen Tuberkulosebehandlung mit dem Kaliumsalz des Cantharidins gewonnenen Erfahrungen rufen bereits 0·2 *mg* häufig Albuminurie hervor.

An der Hand folgender Zahlen läßt sich eine Vorstellung von dem Grade der Resistenz verschiedener Tierarten gegenüber dem Cantharidin gewinnen.

1 *g* Cantharidin ist eine krankmachende Dosis für 350,000 *kg* Mensch, 20,000 *kg* Kaninchen, weniger als 35 *kg* Igel.

1 *g* Cantharidin ist die tödliche Dosis für 20.000 *kg* Mensch, 500 *kg* Kaninchen, 7 *kg* Igel.

Ellinger stellte bei bei seinen Versuchen fest, daß beim Igel fast die ganze Menge des einverleibten Giftes durch die Nieren unverändert ausgeschieden wird. Eine Zerstörung des Cantharidins im Organismus des Igels, eine Entgiftung auf chemischem Wege findet also nicht statt. Daraus folgt, daß die Igelniere dem Cantharidin gegenüber im hohen Grade widerstandsfähig ist. Diese Widerstandsfähigkeit der Igelniere scheint eine spezifische für das Cantharidin zu sein, denn ein anderes „Nierengift", das chromsaure Kalium", mit welchem *Ellinger* einen Versuch zur Beantwortung dieser Frage anstellte, tötete in der gleichen Dosis, welche für ein Kaninchen letal ist, auch einen Igel, dessen Nieren bei der Sektion die gleichen Veränderungen zeigten, wie sie für diese Verbindung für die Kaninchenniere beschrieben worden sind.

Eine Gewöhnung an das Cantharidin tritt auch bei längere Zeit fortgesetzter Einverleibung nicht ein.

Der **Nachweis** einer stattgehabten Vergiftung mit Canthariden oder Cantharidin für forensische Zwecke gelingt leicht; im ersteren Falle durch die Auffindung der glänzenden, grünlich schillernden Teilchen der Flügeldecken im Erbrochenen, sowie im Magen- und Darminhalt. Diese werden nur sehr langsam, wenn überhaupt verändert und können noch lange Zeit nach dem Tode nachgewiesen werden. Der Darm wird zweckmäßig auf-

---

[1]) *A. Ellinger*, Studien über Cantharidin und Cantharidinimmunität. Archiv f. exper. Path. u. Pharmak. Bd. 45. S. 89 (1900) und Bd. 58. S. 424 (1908).

geblasen, getrocknet und dann mit der Lupe untersucht, falls die Untersuchung des Darminhaltes nicht schon die Anwesenheit der charakteristischen, kaum zu verkennenden Körperteile von Canthariden ergab.

Über den chemischen Nachweis des Cantharidins und die Isolierung des letzteren aus dem Inhalt des Magendarmkanals finden sich ausführliche Angaben bei *Dragendorff.*[1]) Auch aus dem Harn kann das Cantharidin in manchen Fällen isoliert werden, wenn große Mengen einverleibt wurden.

Der Nachweis des Cantharidins kann durch Auftragen seiner Lösung in Olivenöl auf die Haut (Kaninchenohr oder menschliche Haut) erbracht werden. Zu diesem Zwecke braucht man nur Bruchteile eines Milligramm in Olivenöl zu lösen und auf die Haut einzureiben. Es zeigen sich dann nach kurzer Zeit die lokalen, entzündlich reizenden Wirkungen des Cantharidins.

Entsprechend seinen Wirkungen gehört das Cantharidin im pharmakologischen System in die Gruppe der sogenannten „Phlogotoxine", welcher neben demselben noch das Euphorbin des Euphorbiumharzes, das im spanischen Pfeffer enthaltene Capsaicin, das Mezereïn der Seidelbastrinde (Daphne mezereum), das Anemonin verschiedener Anemone- und Ranunculusarten und besonders noch das in den Anacardiumfrüchten und dem Giftsumach (Rhus toxicodendron) vorkommende Cardol angehören.[2]) Das Bienengift, welches mancherlei Ähnlichkeiten mit dem Cantharidin in pharmakologischer Hinsicht aufweist, findet auch in dieser Gruppe des natürlichen Systems vorläufig seinen Platz.

Brachinus crepitans L., der Bombardierkäfer, und andere der Gattung Brachinus angehörige Arten spritzen angreifenden Feinden einen dampfförmigen Stoff aus dem Mastdarme entgegen. Die dampfförmige Ejakulation stammt aus zwei in den Mastdarm mündenden Drüsen, die ein flüchtiges Sekret bereiten. Auf die Zunge gebracht, soll der Inhalt einer solchen Drüse schmerzhaftes Brennen verursachen und einen gelben Fleck, wie nach der Einwirkung von Salpetersäure, hinterlassen. Die Substanz erzeugt angeblich auch auf der Haut Jucken und Brennen und färbt dieselbe braunrot. *Karsten*[3]) gibt an, daß das in der Drüse wasserhelle Sekret an der Luft vielleicht Sauerstoff aufnimmt unter Bildung von Stickoxyd und von salpetriger Säure. Der ausgespritzte Dampf reagiert sauer und riecht nach salpetriger Säure. Schlägt sich der ausgespritzte Dampf auf kalte Gegenstände nieder, so bilden sich gelbe, ölartige Tropfen, die in einer wasserhellen Flüssigkeit schwimmen. Bei dem Zerreißen des Sekretbehälters braust der Inhalt auf und der flüssige Rückstand färbt sich rot. Dieselbe Farbe nehmen Wasser und Alkohol an, wenn man das Organ in

---

[1]) *Dragendorff,* Ermittelung von Giften. 4. Aufl. S. 321—324 (1895).
[2]) *Schmiedeberg,* Grundriß der Pharmakologie. 5. Aufl. S. 347 (1906).
[3]) *H. Karsten,* Harnorgane des Brachinus complanatus. Archiv. f. Anat. u. Physiologie. S. 368—374 (1848). Mit Tafeln.

diese Flüssigkeiten bringt. „Die alkoholische Lösung nimmt den Geruch des Salpeteräthers an.“

Von hervorragendem biologischen Interesse wäre die Nachprüfung und Bestätigung einer Angabe von *Loman*[1]), nach welcher Cerapterus quatuormaculatus, ein zur Familie der Paussiden gehöriger Käfer, eine Bombardierflüssigkeit ausspritzt, die freies Jod enthalten soll! *Lomans* Angabe über die Anwesenheit von freiem Jod in dem Sekret von Cerapterus quatuormaculatus stützt sich außer auf der Bläuung von Stärkepapier auf das Verhalten desselben zu Alkohol und Äther.

Auch bei Paussus Favieri, einem in der algerischen Provinz Oran einheimischen Paussiden, hat *Escherich*[2]) das Ausspritzen einer Stärkepapier bläuenden Explosions- oder Bombardierflüssigkeit beobachtet.

Gift der Larven von Diamphidia locusta.

Pfeilgift der Kalachari.

In seinem Reisewerk über Deutsch-Südwestafrika[3]) berichtet *F. Schinz* über die Verwendung einer Käferlarve als Pfeilgift seitens der Buschmänner. Mit dem von *Schinz* ihm überlassenen Materiale, bestehend aus einer Anzahl Kokons (Puppen) und mehreren isolierten eingetrockneten Larven von Diamphidia locusta, sowie einigen, zur vollen Entwicklung gelangten Käfern, stellte *R. Böhm*[4]) zunächst fest, daß die Kokonschalen, die die Larven einhüllenden Häutchen, und auch die zur vollen Entwicklung gekommenen Käfer ungiftig sind. In der trockenen Larve behält das Gift jahrelang seine Wirksamkeit.

Zur Darstellung von Lösungen des Giftes mazerierte *Böhm* die unzerkleinerten Larven in destilliertem Wasser, wobei eine durch Papier leicht filtrierbare klare Flüssigkeit von hellgelber Farbe resultiert, welche das in Wasser leicht lösliche Gift in reichlicher Menge enthält. Zur Verhinderung der sonst rasch eintretenden Zersetzung des Giftes infolge der Entwicklung von Fäulniskeimen, die der Oberfläche der Larven anhaften, wird der Giftlösung zweckmäßig etwas Chloroform zugesetzt.

Die Intensität der Giftwirkung stellte *Böhm* in der Weise annähernd fest, daß er den Trockenrückstand einer Mazeration einer bestimmten Anzahl von Larven in der gleichen Anzahl Kubikzentimeter Wasser bestimmte. Durch zweimalige Extraktion mit Wasser wurden aus den Larven in zwei Versuchen 29 und 20% des Larvengewichtes gelöst. Durch Salzlösungen ließ sich nicht mehr Gift extrahieren als durch Wasser. Die Menge des in

[1]) *C. Loman*, Tijdschrift d. neederl. Dierk. Vereen. (2.) Vol. 1. p. 106—108 (1887). Journ. Royal Microsc. Soc. p. 581 (1887).

[2]) *K. Escherich*, Zur Naturgeschichte von Paussus Favieri Fairm. Verhandlungen der k. k. zoolog.-botan. Ges. in Wien.

[3]) Deutsch-Südwest-Afrika. Forschungsreisen durch die deutschen Schutzgebiete 1884—1887. Oldenburg und Leipzig.

[4]) *R. Böhm*, Über das Gift der Larven von Diamphidia locusta. Archiv f. exp. Pathologie. Bd. 38. S. 424 (1897).

einer einzelnen Larve enthaltenen Giftes variierte von Fall zu Fall, vielleicht infolge der Zersetzlichkeit des Giftes. Eine genaue Dosierung des Giftes war unter diesen Umständen nicht ausführbar. 0·5—1·0 *cm*³ einer nach obigem Verfahren (1 *cm*³ Wasser auf eine Larve) hergestellten ersten Mazeration wirkte bei Kaninchen ausnahmslos tödlich. Die kleinste Menge, welche bei Kaninchen den Tod herbeiführte, war 0·25 *cm*³, entsprechend etwa 0·0015—0·0028 *g* Trockenrückstand.

Die Mazerationsflüssigkeit reagierte stets deutlich sauer; beim Erwärmen trübte sich die Lösung und schied beim Kochen flockige Gerinnsel ab. Alkoholzusatz bewirkte eine flockige Fällung. Die Lösung gab alle die bekannten Reaktionen auf Eiweiß; ihre Wirksamkeit wurde durch Kochen aufgehoben. Der Giftstoff ist durch Ammoniumsulfat aussalzbar und dialysiert nicht. Diesem chemischen Verhalten gemäß mußte der Giftstoff der Larven von Diamphidia locusta vorläufig der Gruppe der „Toxalbumine" eingereiht werden. Neuerdings ist es aber *W. Heubner*[1]) unter Anwendung der **Metaphosphorsäure** als eiweißfällendes Reagens (vgl. oben S. 836) gelungen, aus dem Pfeilgift der Kalachari die wirksame Substanz in eiweißfreiem und wirksamem Zustande zu erhalten.

Die Wirkungen des Giftes der Larven von Diamphidia locusta hat zuerst *F. Starcke*[2]) eingehend studiert. Nach subkutaner Einverleibung dieses Giftes zeigten Kaninchen, Hunde und Katzen niemals stürmische Vergiftungserscheinungen. Als erste Symptome der Wirkung treten Abnahme der Munterkeit, verminderte Freßlust, später Entleerung von blutig und ikterisch gefärbtem Harn ein. Bei Katzen können schon nach 1—2½ Stunden paretische Erscheinungen in den hinteren Extremitäten sich einstellen. Im Harn finden sich reichliche Mengen von Eiweiß und Hämoglobin, rotes, flockiges Sediment, aber keine unveränderten Erythrozyten; Leukozyten und Epithelialzylinder fehlten im Harn. Blutige Darmentleerungen kamen bei Hunden und Katzen nicht vor, bei Kaninchen wurden die Fäzes bei längerer Versuchsdauer weich und breiig. Der Tod erfolgt schließlich unter fortschreitender allgemeiner Lähmung, nachdem, insbesondere bei Katzen und Hunden, sich als charakteristisches Symptom im Laufe einiger Stunden eine zur vollkommenen Reaktionsunfähigkeit führende Abnahme der Sensibilität entwickelt hat. Von der Injektionsstelle ausgehend wurden die anliegenden Gewebspartien in weiter Ausdehnung verändert; diese Veränderungen charakterisieren sich je nach der Dauer und Intensität der Wirkung als diffuse, blutig-ödematöse Infiltration oder als eitrige Entzündung. Auch wenn der Einstich sorgfältig nur unter die Haut geschah, pflanzten sich doch wiederholt die Veränderungen, in die Tiefe gehend, durch die Muskeln und Fascien bis in die Brust- oder Bauchhöhle fort.

---

[1]) *W. Heubner,* Über das Pfeilgift der Kalahari. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 57. S. 358 (1907).

[2]) *F. Starcke,* Über die Wirkungen des Giftes der Larven von Diamphidia locusta. (Pfeilgift der Kalachari). Arch. f. experim. Path. Bd. 38. S. 428 (1897).

Wie die Hämoglobinurie während des Lebens zu den charakteristischen Symptomen der Vergiftung mit dem Larvengifte gehört, so zeigen auch von den inneren Organen die Nieren regelmäßig bei der Sektion die auffallendsten pathologischen Veränderungen, welche als Folge der durch das Gift bedingten Hämoglobinurie aufzufassen sind. Das Larvengift verändert den Blutfarbstoff nicht; es bewirkt nur dessen Austritt aus dem Blutkörperchen in das Plasma; die Hämolyse erfolgt sowohl intra vitam als auch extra corpus im Reagenzglase.

Versuche, welche *Starcke* mit dem Larvengifte an der Konjunktiva und am Ohre von Kaninchen ausführte, ergaben, daß dasselbe in typischer Form den Symptomenkomplex der Entzündung hervorruft. Die weite Verbreitung der entzündlichen Wirkung spricht dafür, daß das Gift mit dem Lymphstrom sich auf größere Entfernungen unverändert verbreiten kann. Hierdurch unterscheidet es sich wesentlich von anderen Entzündung erregenden Stoffen, deren Wirkung eine weit mehr lokalisierte oder zirkumskripte ist.

Die charakteristischen Wirkungen des Giftes der Larven von Diamphidia locusta sind also Lösung des Hämoglobins und Erregung von Entzündung. Die Symptome der Vergiftung während des Lebens und die Sektionsbefunde sind ungezwungen auf diese beiden Wirkungen zurückzuführen. Die in manchen Fällen beobachteten Erscheinungen seitens des Zentralnervensystems sind nach *Heubner* von der Blutveränderung unabhängig; eine spezifische Einwirkung des Giftes auf die Nervenzellen ist nicht ausgeschlossen.

Die Einverleibung des Giftes per os blieb bei einigen an Vögeln angestellten Versuchen ohne schädliche Folgen für diese Tiere. Bei intravenöser Applikation traten bei Hunden die Vergiftungserscheinungen nicht früher als bei subkutaner Einverleibung ein.

Vermes, Würmer.

Klasse der Plathelminthes, Plattwürmer.

Cestodes, Bandwürmer.

In den meisten Fällen verursachen die Bandwürmer nur verhältnismäßig leichte Beschwerden [1]; zuweilen kann sich jedoch auch ein schwerer Krankheitszustand ausbilden. Man hat beobachtet, daß bei Anwesenheit von **Bothriocephalus latus** im Darme, viel seltener bei Anwesenheit von Taenien, sich eine sehr schwere Anämie entwickeln kann, ganz nach Art der sogenannten „perniziösen Anämie". Wird der Bandwurm rechtzeitig abgetrieben, so tritt rasche und vollständige Erholung ein.

---

[1]) *E. Peiper,* Tierische Parasiten des Menschen. Ergebnisse der allgemeinen Pathologie usw. von *Lubarsch* und *Ostertag.* Bd. 3. S. 22—72 (1897). — *E. Peiper,* Zur Symptomatologie der tierischen Parasiten. Deutsche med. Wochenschr. Bd. 23. S. 763 (1897).

Die Ursachen dieser schweren Erscheinungen haben *E. St. Faust* und *T. W. Tallqvist*[1]) auf experimentellem Wege aufgeklärt, indem sie das in Äther lösliche, stark hämolytisch wirkende „Lipoid" des Bothriocephalus latus chemisch eingehend untersuchten und als einzigen hämolytisch wirksamen Bestandteil desselben **Ölsäure** isolierten und erkannten. Die Ölsäure ist im Bothriocephalusorganismus als Cholesterinester enthalten. Dieser wird im Darm durch Desintegrationsvorgänge im Bothriocephalusorganismus frei, wird dann wahrscheinlich fermentativ gespalten und die Ölsäure resorbiert, worauf diese im Blute ihre Wirkungen auf die roten Blutkörperchen entfaltet. Die geschädigten Erythrocyten verschwinden aus dem Blute und es kommt dann zu einer beträchtlichen Abnahme sowohl der Zahl der roten Blutkörperchen als auch des Hämoglobingehaltes des Blutes[2]), sofern nicht die blutbildenden Organe eine energische regeneratorische Tätigkeit entfalten und den Ausfall an Erythrozyten kompensieren. Durch längere Zeit fortgesetzte Verfütterung von Ölsäure ließen sich bei Hunden die gleichen Erscheinungen hervorrufen.[2])

Über den Giftgehalt der **Taenien** liegen Untersuchungen von Messineo und Calamida[3]) vor. Die Würmer wurden mit Sand fein verrieben und mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert. Die durch Tonzellen filtrierten oder auch durch Salzfällung gereinigten Extrakte wurden den Versuchstieren nach den üblichen Methoden einverleibt.

Die genannten Autoren glauben nach ihren Versuchen die Gegenwart eines spezifischen Giftes in den Taenien annehmen zu dürfen, obwohl die beobachteten Erscheinungen, sogar nach der intravenösen Injektion, wenig charakteristisch waren. Die Extrakte sollen Wirbeltierblut hämolysieren und im Organismus des lebenden Tieres auf die Leukozyten positiv chemotaktisch wirken.

Picou und *Ramond*[4]) beobachteten, daß Auszüge von Taenien nur sehr schwer, wenn überhaupt faulen und daß dieselben eine ausgesprochene bakterizide Wirkung zeigen.

Taenia echinococcus v. Sieb., der Hülsenbandwurm, Echinokokkusbandwurm lebt im ausgewachsenen Zustande im Darme des Hundes. Geschlechtsreife Proglottiden und Eier dieses Bandwurmes gelangen

---

[1]) *E. St. Faust* und *T. W. Tallqvist,* Über die Ursachen der Bothriocephalusanämie. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **57**. S. 367—385 (1907).

[2]) *E. St. Faust* und *A. Schmincke,* Über chronische Ölsäurevergiftung. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Supplementband. *Schmiedeberg*-Festschrift. S. 171 (1908). Vgl. auch *Tallqvists* ausführliche Monographien: Über experimentelle Blutgiftanämien. Berlin (Hirschwald) 1900. Zur Pathogenese der perniziösen Anämie mit besonderer Berücksichtigung der Bothriocephalusanämie. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **61** (1907). Literatur!

[3]) *E. Messineo* und *D. Calamida*, Über das Gift der Taenien. Zentralbl. f. Bakt. Abt. 1. Bd. **30**. S. 346 (1901). — *D. Calamida*, Weitere Untersuchungen über das Gift der Taenien. Ebenda. S. 374.

[4]) *R. Picou* und *F. Ramond*, Action bactéricide de l'extrait de Taenia inerme. Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. **51**. p. 176—177 (1899).

durch die Hundefäzes zur Ausscheidung und entwickeln sich im Organismus verschiedener Haustiere, aber auch des Menschen zur Finne, welche schwere, unter Umständen tödlich verlaufende Erkrankungen verursachen kann.

Diese Finne, Echinokokkus, Hülsenwurm, ist in einer Blase, Echinokokkusblase, eingeschlossen. Diese kann die Größe eines Menschenkopfes erreichen und enthält eine größere oder kleinere Menge meistens eiweißfreier Flüssigkeit, in welcher Bernsteinsäure und Zucker vorzukommen pflegen. Echinokokkusblasen finden sich am häufigsten in der Leber, können aber auch in anderen Organen vorkommen.

Die Punktion oder spontane Ruptur einer Echinokokkenblase oder -cyste kann auch beim Menschen Vergiftungserscheinungen hervorrufen (**Intoxication hydatique**[1]). Am häufigsten kommt es bei der Punktion oder Ruptur von Leberechinokokken[2]) zu peritonitischen Erscheinungen und fast regelmäßig entwickelt sich eine Urticaria.

Versuche an Tieren haben ergeben (*Mourson* und *Schlagdenhauffen*[3]), *Humphrey*[4]), daß nach intraperitonealer, intravenöser und subkutaner Injektion von Echinokokkusflüssigkeit Kaninchen und Meerschweinchen bald starben. Nach subkutaner Injektion von filtriertem Inhalt einer Echinokokkusblase sah *Debove*[5]) bei zwei Individuen Urticaria auftreten.

Die chemische Natur der wirksamen Substanz der Echinokokkusflüssigkeit ist unbekannt. *Brieger*[6]) isolierte daraus die Platinverbindung einer Substanz, welche Mäuse schnell tötete.

Die der Ordnung **Turbellaria,** Strudelwürmer, angehörigen Planarien verbreiten einen sehr starken, wahrscheinlich von einer flüchtigen Base herrührenden Geruch. Bei der Destillation von Planarien mit Kalk wurde Dimethylamin erhalten.[7]) Planarien sollen, auf die Zunge gebracht, Brennen und Schwellung der Schleimhaut verursachen. Diese Würmer besitzen nach *Moseley*[8]) in der Haut eigenartige Gebilde (Stäbchen, Körperchen), vergleichbar den Nesselorganen der Coelenteraten.

---

[1]) *C. Achard,* De l'intoxication hydatique. Archive générale de médecine (7). T. 22. p. 410—432 und p. 572—591. Paris 1887. (Literatur.)

[2]) *C. Langenbuch,* Chirurgie der Leber und Gallenblase. 1. Teil. Der Leberechinokokkus. S. 36—198 (1894). — Vgl. auch *A. Goellner,* Die Verbreitung der Echinokokkenkrankheit in Elsaß-Lothringen. Inaug.-Diss. Straßburg 1902. — *Posselt,* Die geographische Verbreitung des Blasenwurmleidens. Stuttgart 1900. — *A. Becker,* Die Verbreitung der Echinokokkenkrankheit in Mecklenburg. Beiträge z. klin. Chirurgie. Bd. **56.** S. 1 (1907).

[3]) *Mourson* und *Schlagdenhauffen,* Nouvelles recherches chimiques et physiologiques sur quelques liquides organiques. Compt. rend. T. **95** (2). p. 793 (1882).

[4]) *Humphrey,* An inquiry into the severe symptoms occasionally following puncture of hydatid cysts of the liver. Lancet. Vol. **1.** p. 120 (1887).

[5]) *M. Debove,* De l'intoxication hydatique. Bulletins et mémoires de la Soc. méd. des hôpitaux. 9 Mars 1888.

[6]) *Langenbuch,* a. a. O. S. 109 u. 110.

[7]) *Geddes,* Sur la chlorophylle animale. Archiv de Zoolog. exp. T. 8. p. 54—57 (1878/1880).

[8]) *H. N. Moseley,* Urticating organs of Planarian worms. Nature. Vol. **16.** p. 475 (1877).

Klasse der Nemathelminthes, Rundwürmer.

Nematodes, Fadenwürmer.

Ascaris lumbricoides Lin., der Spulwurm des Menschen, verursacht bei Kindern vielfach nervöse Erscheinungen, Konvulsionen, Ernährungsstörungen und Anämie. Es fragt sich aber, ob diese Symptome auf reflektorischem Wege zustande kommen oder auf ein von diesen Würmern produziertes Gift[1]) zurückzuführen sind.

In den Ascariden findet sich nach *v. Linstow*[2]) ein flüchtiger Körper von eigenartigem und unangenehmem, pfefferartigem Geruch, welcher die Schleimhäute heftig reizt. Der genannte Autor hatte Gelegenheit, die lokalen Wirkungen des Stoffes an sich selbst kennen zu lernen, indem ihm etwas davon ins Auge kam, worauf heftige, langdauernde Konjunktivitis und Chemosis des betroffenen Auges erfolgten.

Arthus und *Chanson*[3]) sahen drei Personen, die von Pferden stammende Ascariden zergliedert hatten, an Konjunktivitis und Laryngitis erkranken. Diese Autoren injizierten auch Kaninchen lebenden Spulwürmern entnommene Flüssigkeit und sahen die Tiere nach subkutaner Einverleibung von 2 *cm*³ derselben innerhalb 10 Minuten zugrunde gehen.

Trichina spiralis Owen verursacht schwere Erkrankungen, die sogenannte Trichinosis[4]), bei welcher man anfangs Magendrücken, Nausea, Erbrechen, später Durchfälle beobachtet, die zuweilen so heftig werden können, daß die Erscheinungen denjenigen der Cholera ähnlich sind. Es folgen dann die bekannten Erscheinungen seitens der Muskeln und später ein Stadium, welches durch das Auftreten von Ödemen und Hautausschlägen charakterisiert ist. Neben diesen Symptomen bestehen gewöhnlich auch schwere Allgemeinerscheinungen, besonders Fieber, welches zeitweise eine beträchtliche Höhe erreichen kann. Diese Symptome zusammen mit den Erscheinungen seitens des Zentralnervensystems (Kopfschmerzen, Benommenheit, Insomnia) und den Störungen in der Zirkulation sowie gewisse pathologisch-anatomische Befunde (fettige Degeneration der Nierenepithelien) können wohl kaum eine befriedigende Erklärung in der Invasion der Trichinen in die Muskeln finden. Sie nötigen vielmehr zur Annahme einer von den Trichinen bereiteten giftigen Substanz, über welche jedoch bis jetzt nichts Sicheres bekannt ist.

Die schweren Erscheinungen, welche durch **Ankylostoma duodenale Leuck.** hervorgerufen werden, legten auch hier den Gedanken an die Produktion eines Giftstoffes seitens dieser Parasiten nahe (*Bohland*[5]);

[1]) *G. H. F. Nuttall*, The poison given off by parasitic worms in man and animals. American Naturalist. Vol. **33**. p. 247 (1899).

[2]) *O. v. Linstow*, Über den Giftgehalt der Helminthen. Intern. Monatsschr. f. Anatomie u. Physiologie. Bd. **13**. S. 188 (1896). Die Gifttiere. S. 128 (1894).

[3]) *Arthus* et *Chanson*, Accidents produits par la manipulation des Ascarides. Médecine moderne. p. 38 (1896). Zentralbl. f. Bakteriologie. Bd. **20**. S. 264 (1896).

[4]) Vgl. *Peiper*, a. a. O. S. 51—59.

[5]) *K. Bohland*, Über die Eiweißzersetzung bei Anchylostomiasis. Münchner med. Wochenschr. Jg. **41**. Nr. 46. S. 901—904 (1874).

neuerdings hat *L. Preti*[1]) ein hämolytisches Gift nachgewiesen, indem er von Menschen stammende Ankylostomen mit physiologischer Kochsalzlösung in einem Mörser zerrieb. Die auf diese Weise erhaltene, neutral reagierende, trübe Suspension wirkte auf Erythrozyten verschiedener Tierarten hämolysierend. Die wirksame Substanz ist löslich in Alkohol und in Äther, unlöslich in Wasser. Sie ist hitzebeständig und wird durch Trypsinverdauung aus dem „Lipoid" abgespalten und wasserlöslich.

Filaria (Dracunculus) medinensis Gm. (Guineawurm), schmarotzt im Unterhautzellgewebe des Menschen und verursacht Geschwürbildung. Das Zerreißen des Wurmes beim Herausziehen desselben verursacht angeblich heftige Entzündung mit nachfolgender Gangrän. Inwieweit ein „Toxin" für diese Wirkung verantwortlich ist[2]), bleibt vorläufig unentschieden.

Klasse der Annelida, Ringelwürmer.

Lumbricus terrestris L., der gemeine Regenwurm, enthält, wie auch bei anderen, sonst ungiftigen Tieren nachgewiesen ist, nach den Angaben von *Pauly*[3]) während der Brunstzeit einen giftigen Stoff. *Pauly* verfütterte einigen Enten eine größere Anzahl Regenwürmer. Die Tiere wurden von Krämpfen befallen. Gänse und Hühner starben bei ähnlichen Fütterungsversuchen mit Regenwürmern nach einigen Stunden. Das Gift ist in den bei der Sexualfunktion beteiligten Ringen enthalten; von den wässerigen Auszügen dieser Körperteile töteten einige Tropfen Sperlinge: Kaninchen gingen nach der Einverleibung größerer Mengen des wässerigen Auszuges ebenfalls zugrunde. Die Natur des giftigen Stoffes ist unbekannt.

In den Mund- und Schlundteilen unseres gemeinen Blutegels, **Hirudo medicinalis L.**, findet sich eine **Hirudin** genannte Substanz, welche wegen ihrer Verwendung bei Versuchen im Laboratorium hier besprochen werden soll. Das Hirudin ist kein tierisches Gift; es kann ohne Schaden für das Tier direkt in das Blut gespritzt werden, wirkt aber dabei auf das Blut in eigenartiger Weise ein, so daß das Blut eines mit Blutegelextrakt[4]) oder Hirudin[5]) behandelten Tieres seine Gerinnbar-

[1]) *L. Preti*, Hämolytische Wirkung von Ankylostoma duodenale. Münchner med. Wochenschr. Nr. 9. S. 436 (1908).

[2]) *v. Linstow*, Über den Giftgehalt der Helminthen. Internat. Monatsschr. f. Anat. u. Physiol. Bd. **13**. S. 188—205 (1896).

[3]) *M. Pauly*, Der Regenwurm. Der illustrierte Tierfreund. S. 42 u. 79. Graz 1896, zit. n. Physiol. Zentralbl. Bd. **10**. S. 682 (1896).

[4]) *John B. Haycraft*, Über die Einwirkung eines Sekretes des offizinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **18**. S. 209 (1884).

[5]) *Franz Friedrich*, Über den die Blutgerinnung aufhebenden Bestandteil des medizinischen Blutegels. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **49**. S. 342 (1903).

keit auf längere Zeit einbüßt; dabei veranlaßt die wirksame Substanz keine weiteren, direkt wahrnehmbaren Veränderungen des Blutes.

Auf Crustaceenblut ist sie ohne Einfluß, ebenso auf die Gerinnung der Milch.

In dem Maße, wie die koagulationshemmende Substanz durch die Nieren ausgeschieden wird oder im Organismus Veränderungen erleidet, wird auch das Blut wieder gerinnungsfähig.

Das Hirudin scheint eine Deuteroalbumose (?) zu sein. Es löst sich in Wasser und verdünnten Lösungen von Neutralsalzen, nicht aber in Alkohol, Äther und Chloroform. Es gibt die für Eiweißstoffe charakteristischen Farbenreaktionen und wird durch nicht zu lange dauerndes Kochen bei schwach essigsaurer Reaktion nicht unwirksam, ist also kein Ferment, dialysiert nur sehr langsam und nimmt dabei an Wirksamkeit ab. Die gerinnungshemmende Wirkung des Blutegelextraktes und des Hirudins scheint noch nicht genügend aufgeklärt, um eine in allen Punkten befriedigende Erklärung des Vorganges geben zu können.[1] Bei experimentellen, physiologischen und pharmakologischen Arbeiten kann sie aber des öfteren von praktischem Nutzen sein, so z. B. wo es sich um Untersuchungen am lebenden Tiere oder überlebenden Organen handelt, bei denen Kanülen in Gefäße eingebunden und längere Zeit dort belassen werden sollen, bei Durchblutungsversuchen[2] und bei Untersuchungen des (normalen) Blutes außerhalb des Organismus. Das fertige, sehr wirksame (aber teure!) Präparat „Hirudin" wird von der Firma E. Sachsse & Co.[3] in Leipzig-Reudnitz in den Handel gebracht. Im Laboratorium stellt man sich genügend wirksame Extrakte wie folgt her:

Darstellung wirksamer Extrakte aus Blutegeln.

Die abgeschnittenen Köpfe der Blutegel, auf 1 *kg* Körpergewicht des Versuchstieres 3 Köpfe, werden mit trockenem Sand oder Glaspulver verrieben und für je einen Kopf 1 *cm*³ Chlornatriumlösung von 0·70% hinzugefügt. Man läßt das Gemisch unter öfterem Umschütteln 2 Stunden stehen und zentrifugiert dann. Die überstehende Flüssigkeit kann direkt verwendet werden, nimmt aber beim Aufbewahren an Wirksamkeit ab. Das gesamte Blut eines Kaninchens kann für längere Zeit ungerinnbar gemacht werden, wenn man dem Tier ein Extrakt von 3 Köpfen pro Kilogramm

---

[1]) *Andreas Bodong*, Über Hirudin. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 52. S. 242 (1905). — *A. Schittenhelm* und *A. Bodong*, Beiträge zur Frage der Blutgerinnung mit besonderer Berücksichtigung der Hirudinwirkung. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 54. S. 217 (1906). — *E. Fuld* und *K. Spiro*, Der Einfluß einiger gerinnungshemmender Agenzien auf das Vogelplasma. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 5. S. 171 (1904). — *Leo Loeb*, Einige neuere Arbeiten über die Blutgerinnung bei Wirbellosen und bei Wirbeltieren. Biochem. Zentralbl. Bd. 6. S. 893 (1907).

[2]) *Johannes Bock*, Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Gifte auf das isolierte Säugetierherz. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 41. S. 160 (1898).

[3]) Deutsches Reichs-Patent Nr. 136, 103.

Tier in das Blut spritzt. Beim Aufbewahren in der Kälte nimmt das Extrakt weniger schnell an Wirksamkeit ab.

Echinodermata, Stachelhäuter.

1. Asteroidea, Seesterne.

Einige Berichte über Fütterungsversuche[1]) mit Seesternen an Hunden und Katzen, bei welchen die letzteren entweder schwer erkrankten oder starben, scheinen den Verdacht auf die Giftigkeit gewisser Seesterne zu rechtfertigen. Genauere Untersuchungen liegen über diese Frage nicht vor.

2. Echinoidea, Seeigel.

Gewisse Seeigel besitzen wohl ausgebildete Giftapparate, deren sie sich zur Verteidigung und zum Erlangen ihrer Beute bedienen. *Prouho*[2]) und besonders *v. Uexküll*[3]) haben diese Apparate, deren Funktion und Art und Weise ihres Gebrauches genauer untersucht. An den Spitzen der Giftzangen oder „gemmiformen" *(v. Uexküll)* Pedicellarien tritt das in den früher irrtümlich als Schleimdrüsen betrachteten Giftdrüsen bereitete giftige Sekret aus. Das Gift bzw. der Inhalt der Giftdrüse ist eine klare, leicht bewegliche, nicht visköse oder fadenziehende Flüssigkeit, welche schwach sauer reagiert und nach der Entleerung aus der Drüse gerinnt.

Die Wirkungen des Giftsekretes scheinen das Zentralnervensystem der vergifteten Tiere zu betreffen. Bei Fröschen sah *v. Uexküll* nach Bissen, welche das Rückenmark trafen, „allgemeine Krämpfe" auftreten und „kleine Aale von 2 bis 3 *cm* Länge ringelten sich nach dem Bisse zusammen und schlugen wild umher; traf sie der Biß in die Medulla, so war er tödlich" *(v. Uexküll)*.

3. Holothuriodea, Seewalzen, Seegurken.

Die *Cuvier*schen Organe gewisser polynesischer Arten, nahe verwandt oder identisch mit Holothuria argus, sollen auf der menschlichen Haut schmerzhafte Entzündung und, wenn sie in das Auge gelangen, Erblindung verursachen.[4])

Coelenterata (Zoophyta), Pflanzentiere.

Die Coelenteraten zeichnen sich durch den Besitz der nur bei den Schwämmen fehlenden Nesselkapseln aus.

---

[1]) *C. A. Parker,* Poisonous qualities of the Star-fish. The Zoologist. Vol. 5. p. 214 (1881). Zoolog. Jahresbericht. Bd. **1**. S. 202 (1881). — *Husemann,* Handbuch der Toxikologie. S. 242 (1862).

[2]) *H. Prouho,* Du rôle de pédicillaires gemmiformes des oursins. Compt. rend. T. **109**. p. 62 (1890).

[3]) *J. v. Uexküll,* Die Physiologie der Pedicellarien. Zeitschrift f. Biologie. Bd. **37**. (N. F. 19.) S. 334—403 (1899).

[4]) Vgl. b. *W. Saville-Kent,* The great Barrier Reef of Australia. p. 293. London (1893).

Diese sind bei den **Cnidarien, Nesseltieren,** am vollkommensten entwickelt. Wird das Tier gereizt oder will es sich seiner Beute bemächtigen, so wird der Nesselfaden hervorgeschnellt, wobei die neben dem Faden in der Kapsel enthaltene visköse oder gallertige, giftige Masse auf die Oberfläche oder infolge des Eindringens der Fäden in die Tiefe, in den Organismus des Beutetieres oder des Feindes befördert und übertragen wird.

Die lokalen Wirkungen der Sekrete dieser Tiere auf die Haut des Menschen sind allgemein bekannt: sie bestehen in mehr oder weniger heftigem Jucken und Brennen der betroffenen Hautpartie: diese Erscheinungen verschwinden nach längerer oder kürzerer Zeit. Bei kleinen Tieren kann allgemeine Lähmung und der Tod folgen (*Bigelow*[1]), aber auch beim Menschen scheinen, besonders durch das Gift der großen Schwimmpolypen (Siphonophora), welche einen Durchmesser von 25—30 *cm* erreichen, schwere, vielleicht resorptive Erscheinungen nach der Berührung mit diesen Tieren eintreten zu können, wie der von *Meyen*[2]) beschriebene Fall beweist. Der Betreffende erkrankte schwer an „Entzündungen und Fieber". Ähnliches berichtet auch *E. Forbes*[3]) über Cyanea capillata.

Die chemische Natur des Giftes der Coelenteraten haben *Portier* und *Richet*[4]) zuerst untersucht. Sie verrieben Filamente (Nesselfäden) von Physalien und anderen Nesseltieren mit Sand und Wasser und erhielten so giftige Lösungen, mit welchen sie an Tieren Versuche anstellten. Die wässerigen Auszüge wirkten tödlich, die Tiere wurden somnolent und der Tod erfolgte durch Lähmung der Respiration. An der Applikationsstelle schien das Gift keine Schmerzempfindung hervorzurufen. *Portier* und *Richet* nannten die wirksame Substanz „Hypnotoxin".

Richet[5]) ist es gelungen, aus den Tentakeln von Aktinien, durch Behandlung mit Alkohol und Wasser, einen aus Alkohol kristallisierenden, aschefreien Körper, das **Thalassin,** zu gewinnen, welcher unter Zersetzung und Abspaltung von Carbylamin und Ammoniak bei 200° schmilzt. Das Thalassin enthält 10% Stickstoff, scheint aber keine Base zu sein, da es durch Phosphorwolframsäure, Jod-Jodkalium, Platinchlorid und Silber-

---

[1]) *R. P. Bigelow,* Physiology of the Caravella maxima (Physalia Caravella). *Johns Hopkins* University Circular. Vol. **10**. p. 93 (1891).

[2]) Vgl. *O. Schmidt* und *W. Marshall*, *Brehms* Tierleben (niedere Tiere). 3. Aufl. S. 552 u. 553 (1893).

[3]) *E. Forbes,* Monograph of the British naked-eyed Medusae. p. 10—11. London (1848).

[4]) *P. Portier* und *C. Richet,* Sur les effects physiologiques du poison des filaments pêcheurs et des tentacules des Coelenterés (Hypnotoxine). Compt. rend. T. **134**. p. 247 bis 248 (1902).

[5]) *Charles Richet*, Compt. rend. soc. biol. T. 55. p. 246—248. 707—710. 1071 à 1073. Vgl. auch *Malys* Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie. Bd. **33**. S. 709 (1904).

nitrat nicht gefällt wird. In wässeriger Lösung zersetzt sich das Thalassin rasch unter Entwicklung von Ammoniak. Erhitzen des Thalassins auf 100° zerstört dasselbe dagegen nicht. Intravenös injiziert soll das Thalassin bei Hunden schon in Mengen von 0·1 *mg* pro Kilogramm Körpergewicht heftiges Hautjucken, Urticaria und Niessen verursachen, jedoch sind auch 10 *mg* pro Kilogramm Körpergewicht nicht tödlich.

Neben dem Thalassin findet sich in den Tentakeln der Aktinien nach *Richet* eine zweite Substanz, das **Kongestin,** von welchem 2 *mg* pro Kilogramm Körpergewicht Hunde innerhalb 24 Stunden töten. Durch vorhergehende, wiederholte Injektionen von Thalassin konnte die Wirkung des Kongestins stark abgeschwächt werden, so daß nach einer derartigen Vorbehandlung mit Thalassin 13 *mg* Kongestin erst tödlich wirkten. Thalassin und Kongestin scheinen demnach im Verhältnis von „Toxin“ und „Antitoxin“ zueinander zu stehen.

Methoden zur Darstellung von Alkaloiden.

Von **Julius Schmidt**, Stuttgart.

Allgemeines. Die meisten Pflanzenalkaloide sind am Anfange des 19. Jahrhunderts isoliert worden; die giftigen und therapeutisch wertvollen Eigenschaften, welche gewisse Pflanzen infolge des Gehaltes an Alkaloiden zeigen, waren freilich schon von alters her bekannt und benutzt. Verhältnismäßig lange haben die Alkaloide allen Versuchen zur Aufklärung ihrer Konstitution und zur synthetischen Darstellung Widerstand geleistet. Die Entdeckung des Pyridins (1846) und des Chinolins brachte dann auf dem Gebiete der Alkaloidforschung so wichtige Fortschritte, daß allmählich die Überzeugung reifte, die Alkaloide würden sich vom Pyridin und Chinolin in ähnlicher Weise ableiten wie die aromatischen Verbindungen vom Benzol. *Königs* gab (1880) folgende Definition: „Unter Alkaloiden versteht man diejenigen in den Pflanzen vorkommenden organischen Basen, welche Pyridinderivate sind.“ [1] Diese Definition ist aber zu eng gefaßt. Sie schließt Verbindungen wie Caffein und Theobromin von den Alkaloiden aus, welche nach allen ihren Eigenschaften zu denselben gehören. Besser ist es, wenn man als Alkaloide alle stickstoffhaltigen Pflanzenprodukte bezeichnet, welche den Stickstoff in ringförmiger Atomverkettung tragen. Doch haftet auch dieser Definition eine gewisse Willkür an.

Die Alkaloide sind im Pflanzenreiche zwar sehr verbreitet, jedoch auf die verschiedenen Pflanzenklassen und Familien sehr ungleichmäßig verteilt. Die meisten alkaloidführenden Pflanzen gehören den Dikotyledonen an. Unter den Monokotyledonen sind es eigentlich nur die Colchicaceen, welche Alkaloide produzieren, während bei den Kryptogamen diese Pflanzenbasen ganz fehlen. Besonders reich an Alkaloiden sind die Papaveraceen, Solanaceen und Ranunculaceen sowie die den Rubiaceen angehörenden Cinchonaarten. Pflanzen, welche derselben Familie angehören, enthalten meistens dieselben oder einander chemisch und in bezug auf physiologische Wirkung nahestehende Alkaloide, während dieselbe Base nur selten in mehreren Pflanzenfamilien auftritt. Weiter ist zu bemerken, daß dieselbe Pflanze gleichzeitig mehrere Alkaloide enthalten kann. Solche vergesellschaftet auf-

[1] *Königs*, Über Alkaloide. Habilitationsschrift. S. 31. München 1880.

tretende Basen sind z. B. die Opiumalkaloide (Papaver somniferum) und die zahlreichen Basen der Chinarinde (Cinchona).

Die *Verteilung der Alkaloide im Pflanzenkörper* ist eine sehr ungleichmäßige. Am häufigsten sind sie in den Früchten und Samen, bei Baumpflanzen auch in der Rinde angehäuft. Aus Untersuchungen neueren Datums scheint hervorzugehen, daß sich die Alkaloide besonders reichlich in den in kräftiger Entwicklung begriffenen Geweben und im Innern der Zellen befinden, im Zellsaft gelöst. Sie sind als Überbleibsel bei der Tätigkeit des Protoplasmas anzusehen. Einmal gebildet, werden sie nicht von der Pflanze wieder assimiliert und sind somit, wie die Terpene usw., pflanzliche Sekretionsstoffe.

Die Alkaloide finden sich selten im freien Zustande in der Pflanze vor, sondern meistens als Salze in Verbindung mit solchen Säuren, die man gewöhnlich im Pflanzenreich antrifft, wie die Äpfelsäure, Zitronensäure, Oxalsäure, Bernsteinsäure, Gerbsäure etc. Einige Alkaloide sind allerdings auch an spezielle Säuren gebunden, wie die Chinaalkaloide an die Chinasäure, die Opiumalkaloide an die Mekonsäure, das Aconitin an die Aconitsäure etc.

Bei der *Darstellung der Alkaloide aus den betreffenden Pflanzen* bzw. Pflanzenteilen müssen diese natürlichen Salze zuerst zersetzt werden. Sind die Basen flüchtig — wie Nikotin, Coniin und Spartein —, so wird das feingepulverte oder zerquetschte Material mit Kali- oder Natronlauge im Dampfstrom destilliert. Das mit Schwefelsäure oder Oxalsäure neutralisierte Destillat wird eingedunstet und mit Ätheralkohol extrahiert, wobei das Alkaloidsalz aufgenommen wird. Dieses wird dann wieder mit Alkali zersetzt und die freie Base im Wasserstoffstrome destilliert. Zur Gewinnung der nicht flüchtigen Alkaloide wird das mazerierte Pflanzenmaterial meistens mit durch Schwefelsäure oder Salzsäure angesäuertem Wasser extrahiert. Die organisch sauren Salze werden hierbei zersetzt und die Basen gehen als Sulfate bzw. Hydrochloride in Lösung. Aus der eingeengten Lösung können die in Wasser unlöslichen oder schwer löslichen Alkaloide durch Ammoniak, Alkalien, Kalk, Baryt oder Magnesia gefällt werden.

Um die leichter löslichen Basen aus wässerigen oder angesäuerten Lösungen auszufällen, kommen unter anderem Kaliummerkurijodid[1]), Tannin und Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure in Anwendung. Von den letzteren Mitteln, welche von *Sonnenschein*[2]) bzw. *Scheibler* eingeführt wurden, werden sämtliche Alkaloide gefällt. Aus der Tanninverbindung wird das Alkaloid mit Bleioxyd, aus dem durch Zusatz von Phosphormolybdänsäure erhaltenen Niederschlag mit Calciumkarbonat und aus der Merkurijodidverbindung mit Sulfiden oder einer alkalischen Lösung

[1]) *F. Mayer*, Zur Abscheidung von Alkaloiden. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **133**. S. 236 (1865).

[2]) *Sonnenschein*, Neues Reagens auf Stickstoffbasen. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **104**. S. 45 (1857).

von Zinnoxydul ausgeschieden.[1]) Weil die freien Alkaloide und ihre Salze in Weingeist löslich sind, kann auch die Extraktion mit diesem Lösungsmittel vorgenommen werden. In gewissen Fällen lassen sich auch mit Vorteil Amylalkohol oder Chloroform als Ausziehungsmittel anwenden. Durch Behandlung mit salzsäure- oder schwefelsäurehaltigem Wasser werden dann die Alkaloide der Lösung entzogen.[2]) Für die Isolierung und Reindarstellung der einzelnen Alkaloide — oft eine recht schwierige Sache — ist eine große Anzahl spezieller Methoden ausgebildet worden.

Die meisten Alkaloide und namentlich die sauerstoffhaltigen sind feste, nicht destillierbare Körper. Nur einige, Arecolin, Coniin, Nikotin und Spartein, sind flüssig und verflüchtigen sich unzersetzt. Die drei letztgenannten, welche sauerstofffrei sind, besitzen einen ziemlich starken Geruch, während die festen Alkaloide geruchlos sind. Der Mehrzahl nach sind die festen Alkaloide kristallisierbar, einige aber, wie Berberin, Emetin, Curarin, sind nur in amorphem Zustand erhalten worden. Beim Erhitzen über ihren Schmelzpunkt zersetzen sich die meisten dieser Pflanzenbasen. Einige sublimieren jedoch und werden hierbei nicht selten in schönen Kristallen erhalten. In Wasser sind die Alkaloide mit wenigen Ausnahmen unlöslich oder schwer löslich. Das allgemeinste Lösungsmittel für die Verbindungen dieser Körperklasse ist Alkohol. Viele lösen sich auch reichlich in Äther, Amylalkohol, Chloroform und Benzol, welche Solventien zur Trennung verschiedener Alkaloide voneinander benutzt werden können. Bemerkenswert ist, daß der Löslichkeitsgrad bei einem bestimmten Alkaloide wesentlich wechseln kann, je nachdem es in kristallisiertem oder amorphem Zustande sich befindet, eben aus seinen Salzen frei gemacht worden oder nicht mehr frisch ist.

Die meisten Alkaloide sind optisch aktiv, und zwar dreht die Mehrzahl unter ihnen die Ebene des polarisierten Lichtstrahles nach links.

A. Pictet[3]), der verdienstvolle Forscher auf dem Gebiete der Alkaloidchemie, dem wir bekanntlich die vollständige Synthese des Nikotins verdanken, hat *Betrachtungen über Entstehung und Chemismus der Alkaloide in den Pflanzen* angestellt, die sich im wesentlichen folgendermaßen kurz zusammenfassen lassen:

1. Die Alkaloide stellen die stickstoffhaltigen Stoffwechselprodukte der Pflanzenzelle dar und ihr Ursprung ist auf den Zerfall kompliziert zusammengesetzter Stoffe zurückzuführen. Demnach liegen in ihnen keine Assimilations-, sondern Umwandlungsprodukte vor.

2. Der Aufspeicherung der Alkaloide in speziellen Geweben gehen in vielen Fällen chemische Umwandlungen voraus. Hierher gehört z. B. ihre Fähigkeit, sich mit anderen in der Pflanze vorkommenden Verbindungen

[1]) *Guareschi*, Alkaloide. S. 457.

[2]) *v. Uslar* und *Erdmann*, Über eine neue Methode der Darstellung und Nachweisung der Alkaloide. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **120**. S. 121 (1861).

[3]) *Pictet*, Einige Betrachtungen über die Entstehung der Alkaloide in den Pflanzen. Arch. Sc. phys. nat. Genève. [4.] T. **19**. p. 329 (1905); Über die Bildungsweise der Alkaloide in den Pflanzen. Arch. d. Pharm. Bd. **244**. S. 389 (1906).

zu kondensieren. In einigen Fällen erfolgt Kondensation mit Glukose, es tritt der *Glukoserest* in das Molekül ein, so daß Alkaloide, wie Solanin, Achillein, Sinalbin etc., entstehen, die gleichzeitig Glukoside sind. Häufiger treten *Säureradikale* in das Molekül ein, es erfolgt Kondensation mit Säuren, wie Benzoësäure (Kokain, Akonitin), Tropasäure (Atropin), Sinapinsäure (Sinapin), Essigsäure (Colchicin) etc. Am allerhäufigsten aber ist es ein *Alkoholradikal*, das die Gruppen OH und NH sättigt, und zwar der *Methylrest* (CH_3). Ausnahme hiervon findet sich nur beim Piperin, Narkotin, Narceïn, Hydrastin und Berberin, wo (CH_2) durch das Methylenradikal ersetzt ist. Äthyl und höhere Alkylgruppen sind bisher in keinem Alkaloid aufgefunden worden.

Was die Bildung der Methyl- und Methylenderivate anbetrifft, so hält *Pictet* den Formaldehyd, der in den grünen Teilen der Pflanzen gebildet wird, für das methylierende Agens und veranschaulicht das durch die Formeln:

$$R - OH + CH_2O = R - OCH_3 + O$$
$$R = NH + CH_2O = R - NCH_3 + O$$
$$R\langle{}^{OH}_{OH} + CH_2O = R\langle{}^{O}_{O}\rangle CH_2 + H_2O$$

Es würde also nach dieser Hypothese der in den Blättern als erstes Assimilationsprodukt entstehende Formaldehyd methylierend auf die in den Geweben durch Zerfall der Proteinstoffe primär auftretenden Phenole und sekundären Basen wirken. So würden die so häufig in den Pflanzen vorkommenden Methoxy-, Methylendioxy- und N-Methylverbindungen entstehen. Man muß zugestehen, daß die Möglichkeit einer solchen Methylierung durch Formaldehyd nach den Arbeiten von *Tollens*[1]), *Prud'homme*[2]) und *Eschweiler*[3]) gegeben ist.

3. Alkaloide, die den Pyrrolkern enthalten, bilden sich bei dem Zerfall von Proteinstoffen. Bekanntlich hat ja *E. Fischer* die Pyrrolidin-2-karbonsäure (Prolin) als Spaltungsprodukt verschiedener Eiweißkörper bei der Hydrolyse durch Salzsäure gefunden, so daß sie als ein wichtiger Baustein des Eiweißmoleküls betrachtet werden darf. Von *Nencki*, *Zaleski*, *Marchlewski* und *W. Küster* wurde der Zusammenhang des Blutfarbstoffes Hämoglobin und auch des Blattfarbstoffes Chlorophyll mit Pyrrolabkömmlingen dargetan und man kann demnach wohl annehmen, daß Pyrrolderivate in den Pflanzen weit verbreitet sind.

4. Die zahlreichen, den Pyridinkern enthaltenden Alkaloide dürften nach *Pictet* nicht wie die Alkaloide der Pyrrolgruppe die direkten Überbleibsel des Zerfalles komplizierterer Substanzen repräsentieren, sondern

[1]) *Tollens*, Über Rohformaldehyd und Oxymethylen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **16**. S. 919 (1883).

[2]) *Prud'homme*, Eine neue Methode der Methylierung. Bull. Soc. Chim. [3.] T. **23**. p. 69 (1900).

[3]) *Eschweiler*, Ersatz von an Stickstoff gebundenen Wasserstoffatomen durch die Methylgruppe mit Hilfe von Formaldehyd. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **38**. S. 880 (1905).

erst aus diesen Überbleibseln durch sekundäre Phänomene entstehen, die den ursprünglichen Kern verändern. Auch bei diesen Veränderungen soll der Formaldehyd eine große Rolle spielen. Er soll auf die Pyrrolkörper zunächst methylierend einwirken und die so entstehenden Methylpyrrole sollen dann durch Umlagerung den Pyridinkern liefern. Oder einfacher — es könnte das Kohlenstoffatom des Formaldehyds direkt in den Pyrrolkern eintreten, wie dasjenige des Chloroforms oder des Methylenjodids bei den bekannten Synthesen von *Ciamician* und seinen Schülern es auch tut und diesen Pyrrolkern zu einem Pyridinkern erweitern.

Was die *Einteilung des Stoffes* anbetrifft, so ist die chemische Klassifikation der in manchen Lehr- und Handbüchern angewandten botanischen Einteilung vorzuziehen. Wir werden also von den Alkaloiden die wichtigeren auswählen und sie mit Bezug auf ihren basischen Bestandteil klassifizieren. Dabei ordnen sich meistens die von einer und derselben Pflanze erzeugten, also die einer und derselben *natürlichen* Gruppe angehörigen Basen, auch in eine und dieselbe *chemische* Gruppe, weil eben die von einer und derselben Pflanze erzeugten Verbindungen meist eine analoge chemische Struktur haben. Die wichtigen Alkaloide sind also bei der nachfolgenden Besprechung in folgende Gruppen eingeteilt:

I. Alkaloide der Pyridingruppe.
II. Alkaloide der Pyrrolidingruppe.
III. Alkaloide der Chinolingruppe.
IV. Alkaloide der Isochinolingruppe.
V. Alkaloide der Phenanthrengruppe.
VI. Alkaloide der Puringruppe.

Pilocarpin soll im Anschluß an die Alkaloide der Puringruppe behandelt werden.

VII. Verschiedene Alkaloide, meistens unbekannter Konstitution.

Wie jeder Einteilung haftet auch dieser eine gewisse Willkür an. So läßt sich einwenden, daß die in der Pyrrolidingruppe behandelten Alkaloide Atropin und Kokain auch einen Pyridinkern enthalten und deshalb auch in die Pyridingruppe hätten eingereiht werden können. Indessen erscheint es zweckmäßiger, diese Verbindungen in eine Gruppe für sich zusammenzufassen.

Bei V. ist es besser, die Bezeichnungsweise nach dem basischen Komplex, der den Alkaloiden zugrunde liegt, zurzeit nicht anzuwenden. Denn es herrschen noch Zweifel darüber, welcher Art der stickstoffhaltige Ring ist, der den hierher gehörigen Opiumalkaloiden Morphin, Kodein und Thebain zugrunde liegt. Dahingegen wird zurzeit allseitig die Annahme gemacht, daß sie einen Phenanthrenkern enthalten.

I. Alkaloide der Pyridingruppe.

Von den zahlreichen Alkaloiden, die einen Pyridinkern enthalten, sind vor allem die im Schierling vorkommenden Basen Coniin (in der d- und l-Form), Methylconiin (in der d- und l-Form), p-Coniceïn, Conhydrin und

Pseudoconhydrin zu nennen. Sie finden sich in allen Teilen der Pflanze an Äpfelsäure und Kaffeesäure gebunden, besonders in den Früchten vor ihrer vollständigen Reife. Der Menge nach vorwiegend ist das Coniin.

α-Coniin.

d-, α-, n-Propylpiperidin.

$$
\begin{array}{ccc}
 & CH_2 & \\
H_2C & & CH_2 \\
H_2C & & CH-CH_2.CH_2.CH_3 \\
 & NH &
\end{array}
$$

Zur Abscheidung der Base aus den Früchten des Schierlings werden dieselben zerquetscht und mit Kalilauge oder Sodalösung versetzt. Die wahrscheinlich an Apfelsäure gebundene Base wird dadurch frei gemacht und mit Wasserdampf abdestilliert. Um sie von Ammoniak zu trennen, wird das Destillat mit Salzsäure oder Schwefelsäure angesäuert und die Lösung zur Trockene verdampft. Dem Abdampfungsrückstand entzieht man die Salze der organischen Basen mit Alkohol oder Äther. Die Salze werden mit Kali zerlegt und die entstehenden Basen durch Ausschütteln mit Äther gesammelt. Schließlich wird die Rohbase durch Destillation im Wasserstoffstrom fraktioniert. Unter einem Druck von 759 *mm* geht das Coniin bei 165—166° über.

Um reines d-Coniin zu gewinnen, fügt man nach *Wolffenstein*[1]) 135·5 *g* des käuflichen Produktes zu einer Lösung von d-Weinsäure (160 *g*) in Wasser (450 *g*) unter Kühlung und führt in diese Lösung einen Kristallsplitter von d-Coniinbitartrat ein. In Präparaten, die an Coniceïn reicher sind, trennt man die Basen mittelst der salzsauren Salze. Das Hydrochlorid des Coniins ist nämlich in Aceton schwer löslich, während das Salz des γ-Coniceïns in Lösung bleibt.

Das reine d-Coniin ist eine farblose Flüssigkeit vom spez. Gewicht $D^{20} = 0·8440$ und dem Brechungsexponenten $n_D = 1·4505$.[2]) Es destilliert unzersetzt von 165·7—165·9° bei 759 *mm*. Die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{19} = +15·7°$. In der Kälte erstarrt die Base zu einer bei —2° sich verflüssigenden Kristallmasse. Sie ist in Wasser nur wenig (1 : 90) löslich; ihre kaltgesättigte Lösung trübt sich beim Erwärmen. Coniin reagiert alkalisch, ist sehr giftig und oxydiert sich an der Luft.

Über die Trennung der Coniumalkaloide.[3])

Die im Schierling vorkommenden Alkaloide Coniin (in der d- und l-Form), Methylconiin (in der d- und l-Form), γ-Coniceïn, Conhydrin

[1]) *Wolffenstein*, Über Coniin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 27. S. 2615 (1894).

[2]) *Semmler*, Notiz über einige flüssige Alkaloide. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 37. S. 2428 (1904).

[3]) *J. v. Braun*, Über die Trennung der Coniumalkaloide. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 38. S. 3108 (1905).

und Pseudoconhydrin konnten bisher kaum oder doch nur in sehr umständlicher Weise quantitativ getrennt werden. Nachdem die größte Menge des Hauptalkaloids, des Coniins, herausfraktioniert ist, liegt ein an Nebenalkaloiden (Coniceïn, Methylconiin, Conhydrin, Pseudoconhydrin) reiches Gemenge vor. Aus ihm kann Methylconiin, da es unter diesen Basen die einzige tertiäre ist, und Conhydrin sowie Pseudoconhydrin wegen des hohen Siedepunktes (224—226° resp. 229—231°) leicht isoliert werden. Dahingegen ist eine quantitative Isolierung des Coniceïns und des noch vorhandenen Coniins durch fraktionierte Kristallisation ihrer Salze, wie sie bisher versucht worden ist, recht mühsam und läßt sich nicht vollständig erreichen.[1])

v. Braun fand nun, daß das schon seit längerer Zeit bekannte Benzoylconiin[2]) sich in charakteristischer Weise von dem Benzoylierungsprodukt des Coniceïns, dem Benzoyl-4-aminobutylpropylketon = $= C_6H_5 . CO . NH(CH_2)_4 . CO . C_3H_7$ (s. spätere Ausführungen beim γ-Coniceïn, unterscheidet. Während das letztere nicht destillierbar, in Äther schwer löslich, in Ligroin unlöslich ist, wird das Benzoylconiin von diesen beiden Lösungsmitteln sehr leicht aufgenommen und läßt sich unzersetzt destillieren. Es ist eine glyzerinähnliche, farblose Flüssigkeit, welche unter 16 *mm* Druck bei 203—204° siedet. Da nun aus beiden Benzoylierungsprodukten durch Verseifung die zugehörigen Basen leicht wieder gewonnen werden können, so läßt sich die Benzoylierung zu einer Trennung der beiden Amide verwenden.

Die Trennung von Alkaloidgemengen, wie sie bei der Coniinfabrikation abfallen, gestaltet sich demnach folgendermaßen: Nachdem das hochsiedende Conhydrin bei der fraktionierten Destillation entfernt worden ist, benzoyliert man in alkalischer Lösung, schüttelt die vorhandene tertiäre Base mit verdünnter Säure aus, hat dann nur das Gemenge der beiden Benzoylverbindungen voneinander zu trennen und aus diesen die Basen durch Verseifung wieder zu regenerieren.

Synthese des Coniins. Die vor 20 Jahren von *Ladenburg* durchgeführte Synthese des Coniins, welche als die erste künstliche Darstellung eines Alkaloids großes historisches Interesse beansprucht, ist erst in allerjüngster Zeit von *Ladenburg* vollkommen zum Abschluß gebracht worden.[3]) Während früher Picolin und Paraldehyd auf 250—260° erhitzt und so direkt in Allylpyridin (besser Isoallylpyridin), $NC_5H_4 . CH : CH . CH_3$, verwandelt wurden, hat jetzt *Ladenburg* α-Picolin mit Aldehyd und Wasser nur auf

---

[1]) *A. W. Hofmann*, Zur Kenntnis der Coniingruppe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 108 (1885); *R. Wolffenstein*, Über Coniumalkaloide. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **28**. S. 302 (1895).

[2]) *Schotten* und *Baum*, Über die Oxydation des Piperidins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **17**. S. 2549 (1884); *Ladenburg*, Über das Isoconiin und den asymmetrischen Stickstoff. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **26**. S. 854 (1893).

[3]) *Ladenburg*, Über des Isconiin und die Synthese des Coniins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **39**. S. 2486 (1906).

150° erhitzt und so das von ihm früher dargestellte Methylpicolylalkin (Kp. 116—120° unter 13 *mm* Druck), $NC_5H_4.CH_2.CH(OH).CH_3$, gewonnen, dem dann durch Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure Wasser entzogen wurde. So entsteht Allylpiridin, gemengt mit Chlorpropylpyridin, $NC_5H_4.CH_2.CHCl.CH_3$, welches Gemenge durch Reduktion mit Natrium und Äthylalkohol inaktives (razemisches) Coniin vom Kp. 166—168° liefert. Die Base wurde durch Weinsäure gespalten. Man erhält das d-Isoconiinbitartrat in gut ausgebildeten Kristallen vom Fp. 56°.

Das daraus gewonnene d-Isoconiin hat das spezifische Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{16} = 19{\cdot}2°$, während reinstes d-Coniin das Drehungsvermögen 15·6° besitzt.

Umwandlung von Isoconiin in d-Coniin. Zur Vervollständigung der Synthese des Isoconiins war es nötig, das Isoconiin in d-Coniin zu verwandeln. Es gelingt dies leicht durch Erhitzen von Isoconiin mit festem Kali zum Sieden oder durch Erhitzen desselben für sich auf etwa 300°.

Trigonellin.

Methylbetain der Nikotinsäure:

```
        CH
HC         C—CO

HC         CH
        N————O
        CH3
```

Trigonellin findet sich neben Cholin in den Bockhornsamen (von Trigonellum foenum graecum), in den Samen der Erbse (Pisum sativum) und den Samen von Strophantus hispidus und Strophantus Kombé.[1])

Der zerkleinerte Bockhornsamen wird, um das Alkaloid daraus zu isolieren, mit Alkohol extrahiert. Aus dem Extrakt werden nach Abdampfen des Alkohols und Fälien mit Bleiessig und Soda die Alkaloide durch Jodkaliumwismutjodid und Schwefelsäure abgeschieden. Der Niederschlag wird zur Entfernung von Eiweißstoffen mit Soda zerlegt, die filtrierte Flüssigkeit mit Schwefelsäure neutralisiert und mit Quecksilberchloridlösung gefällt, wobei sich aus der neutralen Lösung nur das Cholin ausscheidet. Erst beim Ansäuern der abfiltrierten Flüssigkeit mit Schwefelsäure kommt das Trigonellinquecksilberjodid zur Abscheidung. Aus ihm wird die Base durch Zerlegen mit Sulfiden oder einer alkalischen Lösung von Zinnoxydul erhalten.

Zur Darstellung von Cholin, Betain, Trigonellin aus Samen und Keimpflanzen, insbesondere auch aus den als Abfall des Müllereiprozesses

[1]) *H. Thoms,* Über das Vorkommen von Cholin und Trigonellin in Strophanthussamen und über die Darstellung von Strophanthin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **31**. S. 271 u. 404 (1898).

erhältlichen „Weizenkeimen“ empfiehlt *E. Schulze*[1]) folgendes Verfahren: Die wässerigen Extrakte werden zunächst von den durch Bleiessig fällbaren Bestandteilen befreit, dann entweder die von Blei befreite Flüssigkeit eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit siedendem Alkohol behandelt, die abfiltrierte alkoholische Lösung mit einer alkoholischen Mercurichloridlösung versetzt, oder die Basen aus dem Extrakt mit Phosphorwolframsäure gefällt, der mit Kalk oder Baryt zerlegte Niederschlag unter Chlorwasserstoffzusatz verdunstet, der Verdampfungsrückstand mit heißem Alkohol behandelt und die Lösung mit Mercurichlorid versetzt. Aus der bei der Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages erhaltenen, mit Salpetersäure neutralisierten Lösung werden durch Silbernitrat die Alloxurbasen, dann durch Silbernitrat und Barytwasser Histidin und Arginin gefällt. Die im Filtrat vom Argininsilberniederschlage noch enthaltenen Basen werden wieder in Phosphorwolframsäureverbindungen übergeführt, die nach Zerlegen mit Baryt erhaltene eingedunstete Lösung nach Entfernung des Baryts und Chlorwasserstoffzusatz zur Trockene eingedampft, die Basenchloride mit Alkohol behandelt, die Lösung mit Mercurichlorid versetzt. Die Quecksilberdoppelsalze von Cholin, Betain, Trigonellin werden durch Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Mercurichlorid gereinigt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das eingedunstete Filtrat im Vakuumexsikkator vollständig getrocknet, dann zur Extraktion des salzsauren Cholins mit kaltem, absolutem Alkohol behandelt; diese Prozedur wird noch einmal wiederholt. Der so gewonnene Rückstand besteht entweder aus dem Chlorid des Betains oder aus demjenigen des Trigonellins. Ein gleichzeitiges Vorkommen dieser beiden Basen in einer Pflanze wurde bisher niemals beobachtet. Um das Betainchlorid und das Trigonellinchlorid von Cholin vollständig zu befreien, werden diese aus Wasser oder verdünntem Alkohol umkristallisiert; das Cholinchlorid geht dabei in die Mutterlauge über.

Synthetisch ist das Trigonellin von *Hantzsch*[2]) dargestellt worden entsprechend dem Schema:

$-CO_2H$ ... N $\xrightarrow{CH_3J}$ $-COOCH_3$ ... N ... CH_3J $\xrightarrow{AgOH}$ $-CO$ ... N—O ... CH_3

Außerdem entsteht es durch Oxydation von Nikotinisomethylammoniumhydroxyd mit Kaliumpermanganat.[3])

[1]) *E. Schulze*, Über die zur Darstellung von Cholin, Betain und Trigonellin aus Pflanzen verwendbaren Methoden und über die quantitative Bestimmung dieser Basen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 155 (1909).

[2]) *Hantzsch*, Synthese des Trigonellins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 31 (1886).

[3]) *Pictet* und *Genequand*, Oxydation des Nikotinisomethylhydroxyds. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 2122 (1897).

Trigonellin kristallisiert mit 1 Mol. Kristallwasser aus 96%igem Alkohol in farblosen Prismen, ist hygroskopisch, sehr leicht in Wasser, leicht in heißem Alkohol löslich, unlöslich in Äther, Chloroform und Benzol. Beim Erhitzen verliert es erst Wasser und schmilzt dann etwa bei 130° in seinem Kristallwasser. Entwässert färbt es sich bei 200° dunkel und schmilzt bei 218° unter Zersetzung.

Piperin.

```
          CH2
  H2 C  /    \ CH2
       |      |
  H2 C  \    / CH2                     CH
          N                      HC  /   \\ CO
          |                         ||      |    > CH2
         CO . CH : CH . CH : CH      C  \   // CO
                                          CH
```

Die Früchte und Samen verschiedener Pfefferarten enthalten neben einem Terpen eine ziemlich bedeutende Menge (7—9%) Piperin (monokline Säulen vom Schmp. 128—129°), welches von *Oersted* 1819 entdeckt wurde.

Zu seiner Darstellung verfährt man zweckmäßig folgendermaßen[1]): Die Mischung von Pfefferpulver (am besten eignet sich weißer Pfeffer) und dem doppelten Gewicht gebrannten Kalkes wird mit wenig Wasser zum homogenen Brei angerührt und die Masse während 15 Minuten zum Sieden erhitzt. Die auf dem Wasserbad gut getrocknete und nochmals pulverisierte Masse wird mit Äther extrahiert und die Lösung nach Abdampfen der Hauptmenge des Lösungsmittels der freiwilligen Verdunstung überlassen. Hierbei scheidet sich Piperin in Form dicker, gelb gefärbter Prismen aus, die durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt werden.

Synthese des Piperins. Durch Kochen mit alkoholischem Kali wird das Piperin gespalten in Piperidin und Piperinsäure. Aus diesen Spaltungsprodukten kann das Alkaloid wieder aufgebaut werden, indem man Piperidin in Benzollösung mit Piperinsäurechlorid erhitzt.[2]) Das Piperidin ist bekanntlich schon vor längerer Zeit von *Ladenburg* synthetisch dargestellt worden. Auch die Synthese der Piperinsäure hat *Ladenburg* in Gemeinschaft mit *Scholtz*[3]) ausgeführt, so daß die Synthese des Piperins eine vollständige genannt werden kann.

[1]) *Cazeneuve* et *Caillot*, Über Darstellung von Piperin. Bull. soc. chim. [2.] T. **27**. p. 290 (1877).

[2]) *Rügheimer*, Künstliches Piperin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **15**. S. 1390 (1882); Ann. d. Chem. Bd. **159**. S. 142 (1883).

[3]) *Ladenburg* und *Scholtz*, Synthese der Piperinsäure und des Piperins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **27**. S. 2958 (1894).

Arecaidin
oder
N-Methyl-Δ³-tetrahydroniko-
tinsäure:

$$\begin{array}{ccc} & CH & \\ H_2C & & C.COOH \\ | & & | \\ H_2C & & CH_2 \\ & N.CH_3 & \end{array}$$

Arecolin
oder
N-Methyl-Δ³-tetrahydroniko-
tinsäuremethylester.

$$\begin{array}{ccc} & CH & \\ H_2C & & C.COOCH_3 \\ | & & | \\ H_2C & & CH_2 \\ & N.CH_3 & \end{array}$$

Die Areca- oder Betelnüsse, die Samen der Arecapalme (Areca Catechu) enthalten die folgenden vier Alkaloide, welche sich darin in Verbindung mit Gerbsäure neben einer kleinen Menge Cholin vorfinden: Arecaidin $C_7H_{11}NO_2$, Arecolin $C_8H_{13}NO_2$, Guracin $C_6H_9NO_2$, Arecain $C_7H_{11}NO_2$. Man kultiviert die Arecapalme in Vorder- und Hinterindien, da die Betelnuß in großen Quantitäten zum Betelkauen verbraucht wird. Zu dem Ende werden die Nüsse mit etwas Kalk und den Blättern des Betelpfeffers gekaut. Die berauschende Wirkung, die dem Betelkauen folgt, ist aber nur teilweise den in der Betelnuß vorhandenen Alkaloiden zuzuschreiben.[1])

Das Arecolin ist das Hauptalkaloid der Betelnuß und findet sich darin in einer Menge von 0·1%. Es ist eine ölige, farb- und geruchlose Flüssigkeit vom Siedepunkt 209°, die mit Wasserdämpfen flüchtig ist. Das Arecaidin kommt in einer Menge von etwa 0·07% in der Betelnuß vor. Es kristallisiert mit einem Molekül Kristallwasser in Tafeln: nach dem Entwässern schmilzt es unter Zersetzung bei 223—224°. Es löst sich leicht in Wasser, sehr schwer in absolutem Alkohol, gar nicht in Äther, Chloroform und Benzol.

Zur Isolierung der Basen wird das Gemenge derselben mit Wasser, dem man auf 1 *kg* Samen 2 *g* konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt hat, dreimal kalt ausgezogen, die abgepreßten und filtrierten Auszüge bis etwa auf das Gewicht des angewandten Rohmaterials eingedampft und nach dem Erkalten und abermaligen Filtrieren mit Kaliumwismutjodid und Schwefelsäure gefällt: hierbei ist ein Überschuß des Fällungsmittels, welches lösend auf die abgeschiedenen Doppelsalze wirkt, zu vermeiden. Der rote, kristallinische Niederschlag wird nach einigen Tagen abfiltriert, ausgewaschen und durch Kochen mit Bariumkarbonat und Wasser zerlegt, wobei die Alkaloide in Lösung gehen. Die Flüssigkeit wird auf ein kleines Volumen eingedampft und mit genügend Bariumhydroxyd versetzt. Durch wiederholtes Ausschütteln mit Äther wird dann Arecolin ausgezogen.

Die rückständige Flüssigkeit wird hiernach mit Schwefelsäure neutralisiert und die Alkaloide durch aufeinander folgende Behandlung derselben mit Silbersulfat, Bariumhydroxyd und Kohlensäure frei gemacht. Die zur Trockene verdampfte Lösung der reinen Alkaloide wird mit kaltem,

[1]) *Tschirsch,* Indische Nutz- und Heilpflanzen.

absolutem Alkohol oder Chloroform ausgezogen. Cholin geht hierbei neben Farbstoffen und anderen Körpern in Lösung, während Arecain ungelöst bleibt.

Die Ausbeute an Arecolin beträgt 0·07—0·1, die an Arecain etwa 0·1%. Außerdem enthält die Droge Arecaidin in kleinen Mengen, welches leichter durch Verseifen von Arecolin erhalten wird, und Guvacin. Das Arecaidin bleibt in den Mutterlaugen des Arecains zurück. Die beiden Basen lassen sich durch Behandlung mit Methylalkohol und Salzsäure trennen, wobei Arecaidin in Arecolin übergeht, während Arecain nur in das salzsaure Salz verwandelt wird.

Guvacin scheint das Arecain in manchen Sorten der Samen in wechselnden Mengen zu vertreten. Es ist in Wasser und verdünntem Alkohol etwas schwerer löslich als Arecain und Arecaidin und scheidet sich daher aus der Lösung des Gemenges zuerst aus. Salzsäure und Methylalkohol greifen es ebenfalls nicht an, wodurch es sich von Arecaidin trennen läßt.

Die erste Synthese des Arecaidins durch *Jahns* [1]) gelang von der β-Pyridin-karbonsäure (Nikotinsäure) aus auf folgendem Wege: Getrocknetes nikotinsaures Kalium wird mit einem Überschuß von Methyljodid auf 150° erhitzt; es bildet sich ein zuerst von *Hantzsch* [2]) dargestelltes Jodmethylat des Nikotinsäuremethylesters, das mittelst Chlorsilber in das Hydrochlorid übergeführt wird. Bei der Reduktion des letzteren mit Zinn und Salzsäure wird der Ester verseift unter gleichzeitiger Anlagerung von Wasserstoff an den Pyridinkern und es bildet sich gleichzeitig Methyltetrahydronikotinsäure und Methylhexahydronikotinsäure.

Eine zweite Synthese des Arecaidins und Arecolins ist in der Neuzeit von *Wohl* und *Johnson* [3]) durchgeführt worden. Dieselbe geht aus vom Methylamido-β-dipropionaldehyd-teträthylacetal

$$CH_3 . N \begin{matrix} CH_2 . CH_2 . CH(OC_2H_5)_2 \\ CH_2 . CH_2 . CH(OC_2H_5)_2 \end{matrix} .$$

Es liefert bei der Einwirkung von konzentrierter Salzsäure den N-Methyl-Δ³-tetrahydropyridinaldehyd.

$$\begin{matrix} & H_2C & — & CH_2 & \\ CH_3 . N \langle & & & \rangle CH & . \\ & H_2C & & C . CHO & \end{matrix}$$

Das Hydrochlorid desselben läßt sich über das Oxim und Nitril in guter Ausbeute in die zugehörige Säure überführen und diese erwies sich mit dem natürlichen Arecaidin in allen Punkten identisch.

Arecolin entsteht synthetisch durch Methylieren des Arecaidins.

[1]) *Jahns*, Über die Alkaloide der Arekanuß. Arch. d. Pharm. Bd. **229**. S. 669.

[2]) *Hantzsch*, Über Ammoniumderivate von Säureäthern des Pyridins und Chinolins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 31 (1886).

[3]) *Wohl* und *Johnson*, Über Arecaidin und Arecolin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **40**. S. 4712 (1907).

Nikotin.

1-Methyl-2-β-Pyridyl-Pyrrolidin.

```
                              CH3
                              |
       CH                     N
  HC ⁄    ⟍ C ———— CH ⁄   ⟍ CH2
   |       |          |        |
  HC      CH     H2C ———— CH2
     ⟍   ⁄
       N
```

Das Nikotin findet sich, an Apfelsäure und Zitronensäure gebunden, in den Tabaksblättern (Nicotiana Tabacum).

Obige Konstitutionsformel ist im Jahre 1893 von *Pinner*[1]) aufgestellt und vor kurzem von *A. Pictet*[2]) und *Rotschy* durch die vollständige Synthese des Alkaloids endgültig bewiesen worden.

Das l-Nikotin ist das in der Natur vorkommende Alkaloid und kann auch erhalten werden durch Spaltung des synthetischen i-Nikotins mit Weinsäure. Es kommt je nach der Art des Tabaks in Mengen von 0·6 bis 8% vor. In Pfeifentabaken variiert die Menge von 0·518—0·854%, in Zigarren von 0·801—2·887%. Im allgemeinen enthalten die feinen Tabaksorten weniger Nikotin als die gewöhnlichen.

Um die Base aus der Pflanze zu isolieren, werden die Blätter mit Wasser, eventuell unter Zusatz von wenig Salzsäure oder Schwefelsäure ausgezogen, die Lösung wird auf ein Drittel eingedampft und der Rückstand nach Zugabe von Kalk (10%) destilliert. Die übergehende Base wird in das Oxalat verwandelt, mit Kali wieder abgeschieden, mit Äther aufgenommen und nach Verdunsten des Äthers im Wasserstoffstrome destilliert. Noch einfacher erhält man das Alkaloid aus dem sog. Tabaksextrakt, welcher fabriksmäßig zur Imprägnierung von Kautabak durch Extraktion sehr nikotinreicher Rohtabake mit kaltem Wasser und Abdampfen der Lösung hergestellt wird. Derselbe enthält ca. 8—10% Nikotin. Er wird zunächst mit Wasser verdünnt, dann zur Entfernung von Kohlenwasserstoffen aus saurer Lösung mit Äther extrahiert, mit Alkali übersättigt. Das freie Nikotin wird hierauf durch wiederholte Ätherextraktion gesammelt, der Ätherextrakt wird getrocknet und fraktioniert destilliert.[3])

Synthese des i-Nikotins.

Pictet und *Crépieux* stellten durch Erhitzen von β-Aminopyridin (I) mit Schleimsäure das N-β-Pyridylpyrrol (II) dar. Nach Analogie mit dem entsprechenden Acetyl- und Phenylpyrrol lagert sich das N-β-Pyridylpyrrol

[1]) *Pinner*, Über Nicotin. Die Konstitution des Alkaloids. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **26**. S. 294 (1893).

[2]) *A. Pictet* und *Rotschy*, Synthese des Nicotins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **37**. S. 1225 (1904).

[3]) *Baumann*, Darstellung von Nikotin. Arch. d. Pharm. Bd. **231**. S. 378 (1893).

beim Erhitzen auf höhere Temperatur (Destillation durch schwach glühende Röhren) in α, β-Pyridylpyrrol (III) um, aus dem mit Jodmethyl eine Verbindung entsteht, die mit Nikotyrinjodmethylat (IV) identisch ist.

I.

CH
HC C . NH_2
HC CH
N

→

II.

CH CH CH
HC C——N
HC CH CH CH
N

→

III.

C——C
N
H

→

IV.

HC——CH
C——C CH
N
CH_3
N
J CH_3

Nikotyrinjodmethylat.

Von diesem aus konnte *Pictet* nunmehr weiter zum Nikotin gelangen.

Durch Destillation mit Kalk konnte er der Verbindung IV 1 Mol. Jodmethyl entziehen. Die so erhaltene Base (V) ist identisch mit dem Nikotyrin, welches *Étard* durch gemäßigte Oxydation des Nikotins darstellte.

Es war nunmehr die Rückverwandlung des Nikotyrins in Nikotin (VI) zu bewerkstelligen.

V.

CH——CH
C——C CH
N
CH_3
N

Nikotyrin

VI.

CH_2——CH_2
C——C CH_2
N
CH_3
N

Nikotin.

Da die beiden Basen zueinander in derselben Beziehung stehen wie Pyrrol und Pyrrolidin, hat man zu diesem Zwecke vier Wasserstoffatome in den Pyrrolkern des Nikotyrins einzuführen, ohne zu gleicher Zeit den Pyridinkern zu hydrieren.

Diese Reduktion einer Hälfte des Moleküls erwies sich aber als nicht direkt ausführbar, da sich die beiden ungesättigten Ringe des Nikotyrins bei der Hydrierung durchaus ähnlich verhalten. Bei Anwendung schwacher Reduktionsmittel wird keiner angegriffen, bei energischer Hydrierung werden aber stets beide gleichzeitig reduziert.

Man kommt aber zum Ziele, wenn man zuerst ein Atom Jod in den Pyrrolkern einführt, was leicht durch Behandlung des Nikotyrins mit Jod

in alkalischer Lösung geschieht. Das so gewonnene Jodnikotyrin läßt sich dann schon durch Zinn und Salzsäure reduzieren, wobei ein Dihydronikotyrin (VII) entsteht, welches verschieden ist sowohl von dem Dehydronikotin von *Pinner* und *Wolffenstein*, wie auch von dem Nikotein, welches *Pictet* und *Rotschy* im Tabak aufgefunden haben. Mit Brom behandelt, liefert dieses Dihydronikotyrin ein Perbromid (VIII).

VII. VIII.

HC——CH₂ BrC——CH₂

C——C CH₂ C——C CH₂

N N

CH₃ H CH₃ Br.Br₂

N N

Dieses läßt sich mit Zinn und Salzsäure weiter reduzieren; es entsteht eine Base, die alle Eigenschaften des Nikotins, das Drehungsvermögen ausgenommen, besitzt.

Zur *Gewinnung des l-Nikotins aus i-Nikotin* verfährt man folgendermaßen.[1]) Das i-Nikotin (1 Mol. Gew.) wird zu einer Lösung von Rechtsweinsäure (2 Mol. Gew.) in möglichst wenig Wasser gegeben. Die sich ausscheidenden Kristalle werden so lange umkristallisiert, bis sie den Schmelzpunkt 88—89° vom Bitartrat des l-Nikotins zeigen. Dann wird aus dem Salze die Base durch Natronlauge in Freiheit gesetzt, mit Äther extrahiert, über Kali getrocknet und destilliert.

Das l-Nikotin ist, frisch bereitet, ein farbloses Öl, das sich in Wasser leicht löst und einen unangenehmen, betäubenden, in reinem Zustande nicht an Tabak erinnernden Geruch und brennenden Geschmack besitzt. Es ist nur im Wasserstoffstrome oder im Vakuum unzersetzt destillierbar; an der Luft bräunt es sich bald und verharzt. Der Siedepunkt[2]) liegt bei 246·1 bis 246·2° unter 730·5 *mm* Druck. Das spezifische Gewicht[2]) $d_4^{10} = 1{\cdot}0180$, $d_4^{20} = 1{\cdot}0097$. Das spezifische Drehungsvermögen[2]) $[\alpha]_D^{20} = -166{\cdot}39^0$. Brechungsexponent bei $20^0 = 1{\cdot}5280$. Die Base ist außerordentlich giftig. Die Salze derselben sind zweisäurig, leicht löslich, schwer kristallisierend und drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts.

Physiologische Eigenschaften der beiden aktiven Nikotine.

A. Mayor[3]) hat bei der physiologischen Prüfung der beiden aktiven Nikotine folgende Resultate erhalten:

Sowohl beim Meerschweinchen als beim Kaninchen sind die Wirkungen äußerst verschieden, je nachdem Rechts- oder Linksnikotin zur Anwendung

[1]) *Pictet* und *Rotschy*, Synthese des Nikotins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **37**. S. 1230 (1904).

[2]) Synthese des Nikotins. Ebenda. S. 1231.

[3]) Synthese des Nikotins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **37**. S. 1233 (1904).

kommt. Vor allem ist festzuhalten, daß Linksnikotin eine zweimal stärkere allgemeine Giftigkeit besitzt als Rechtsnikotin, wenn man als Versuchstier das Meerschweinchen benutzt und wässerige Lösungen unter die Haut einspritzt, welche 1% durch Salzsäure genau neutralisiertes Alkaloid enthalten. Für das Linksnikotin beträgt die tödliche Dosis bei Meerschweinchen von nicht über 300 *g* Gewicht 1 *mg* pro 100 *g*. Beim Rechtsnikotin braucht es 2 *mg* pro 100 *g* Gewicht, um den Tod herbeizuführen.

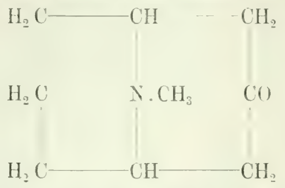
Außerdem ist das Vergiftungsbild ganz bedeutend verschieden. Das Linksnikotin, und zwar sowohl das natürliche als das künstliche, bewirkt beim Meerschweinchen sogleich nach der Einspritzung eine gewisse Erregung; das Tier stößt Schreie aus, was auf heftigen Schmerz schließen läßt. Die Einspritzung von Rechtsnikotin scheint dagegen schmerzlos zu sein. Nach Vergiftung mit Linksnikotin treten alsbald Lähmungserscheinungen auf; die hinteren Extremitäten sind zuerst ergriffen, die anderen folgen bald nach. Die Atmung verschnellert sich, sie wird tief, ausgezogen und mühsam. Bald darauf durchlaufen kleine Zuckungen den Rumpf und die Glieder und schließlich tritt ein heftiger Krampfanfall auf. Wenn die verabreichte Dosis tödlich ist, lassen dann die Krampferscheinungen allmählich nach; die Atmungsbewegungen werden immer seltener, das Herz schlägt langsamer und der Tod tritt durch Stillstand der Atmung ein. Ganz anders verhält es sich mit dem Rechtsnikotin. Die gleiche Dosis von 1 *mg* pro 100 *g* Versuchstier bewirkt nichts anderes als ein Sträuben des Felles und ein leichtes Zittern. Auch diese geringfügigen Symptome zeigen sich nur vorübergehend, und das Tier kehrt darauf ziemlich schnell in seinen Normalzustand zurück. Vergrößert man die Dosis bis zu 1·5 *mg*, so verstärkt sich nur das Zittern, nach und nach erholt sich aber das Tier. Nimmt man Kaninchen zu diesen Versuchen und spritzt man das Gift in die hintere Randvene des Ohres ein, so findet man den gleichen Unterschied in der Wirkungsweise der zwei Nikotinarten.

Pictet und *Rotschy* machen darauf aufmerksam (l. c.), daß in der verschiedenen Wirkung der beiden Nikotine auf den tierischen Organismus wohl ähnliche Verhältnisse vorliegen wie im Verhalten optischer Antipoden gegen organisierte und nicht organisierte Fermente, welche besonders durch die Arbeiten von *Pasteur* und *E. Fischer* bekannt geworden sind.

Alkaloide der Granatbaumrinde.

Die Rinde des Granatbaums (Punica Granatum L., Familie der Myrtaceen) enthält mehrere Alkaloide, denen sie ihre schon lange bekannte Wirkung als wurmabtreibendes Mittel verdankt. *Tanret* fand diese Alkaloide im Jahre 1877 auf, und zwar konnte er die folgenden vier isolieren: Pelletierin $C_8H_{15}NO$, Isopelletierin $C_8H_{15}NO$, Methylpelletierin $C_9H_{17}NO$, Pseudopelletierin $C_9H_{15}NO$. Die Sulfate und Tannate der *Tanret*schen Alkaloide, die nach dem französischen Chemiker *Pelletier* benannt sind, werden statt der Granatrinde als Bandwurmmittel benutzt.

Die Konstitution des **Pseudopelletierins** oder Methylgranatonins wurde von *Ciamician*[1]) und *Silber* festgestellt. Es ist ein Azelaon mit einer Stickstoffbrücke, eine polyzyklische Verbindung entsprechend der Formel:



Um die Base zu gewinnen, wird nach *Tanret*[2]) die zerkleinerte Granatbaumrinde mit Kalkmilch vermischt und das Gemenge mit Chloroform ausgezogen. Die Chloroformlösung schüttelt man mit überschüssiger verdünnter Schwefelsäure durch. Aus der schwefelsauren Lösung scheidet man die Basen vermittelst Natronlauge ab und nimmt sie in Äther auf. Beim Verdunsten des Lösungsmittels hinterbleibt ein Rückstand, aus dem sich Kristalle ausscheiden. Sie werden von der Mutterlauge durch Absaugen getrennt und nach dem Trocknen aus siedendem Petroläther kristallisiert. Die Base scheidet sich in wasserfreien, prismatischen Tafeln ab, die bei 48° schmelzen.

Die übrigen, oben erwähnten Alkaloide der Granatwurzelrinde werden folgendermaßen erhalten. Man extrahiert aus der mit Kalkmilch vermischten fein pulverisierten Rinde zunächst sämtliche Basen mit Chloroform und entzieht sie der Chloroformlösung mit Salzsäure. Vermischt man nun die so erhaltene Lösung der Salze mit überschüssigem Natriumkarbonat, so nimmt Chloroform aus derselben Methyl- und Pseudopelletierin auf. Ätzkali scheidet dann aus der extrahierten Flüssigkeit Pelletierin und Isopelletierin ab, welche nun ebenfalls mit Chloroform ausgeschüttelt werden können. Letztere lassen sich mittelst ihrer neutralen Salze, wenngleich schwierig, trennen, indem das Isopelletierinsalz im Gegensatz zu dem Pelletierinsulfat zerfließlich ist und daher, wenn das Gemisch derselben, z. B. zwischen Filtrierpapier, feuchter Luft ausgesetzt wird, in das Papier allmählich übergeht. Erstere dagegen können durch Äther getrennt werden, aus welchem das Pseudopelletierin ziemlich leicht kristallisiert. Da Methylpelletierin bei 215°, Pseudopelletierin bei 246° siedet, lassen sich beide auch durch fraktionierte Destillation trennen.

---

[1]) *Ciamician* und *Silber*, Über Pseudopelletierin, ein Alkaloid aus der Granatwurzelrinde. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **25**. S. 1601 (1892); Über das Pseudopelletierin. Bd. **26**. S. 156; Über die Alkaloide der Granatwurzelrinde. S. 2738 (1893); Über die Alkaloide der Granatwurzelrinde. Bd. **27**. S. 2850 (1894); Über die Alkaloide der Granatwurzelrinde. Bd. **29**. S. 481; Über das n-Methyltroponin. S. 490; *F. Garelli* und *Ciamician*, Kryoskopische Versuche zur Lösung der Frage nach der Konstitution der Tropaninund Grenatinbasen. S. 2972 (1896).

[2]) *Tanret*, Bull. soc. chim. T. **32**. p. 466 (1879); Compt. rend. T. **88**. p. 716; T. **90**. p. 695.

Pelletierin, $C_8H_{15}NO$, ist eine ölige Flüssigkeit, die unter 100 *mm* bei 125°, unter gewöhnlichem Druck bei 195° siedet. Eine Lösung des Sulfates zeigt $[\alpha]_D = -30^0$. — Isopelletierin, $C_8H_{15}NO$, zeigt gleichen Siedepunkt und gleiche Löslichkeit wie Pelletierin, ist aber optisch inaktiv. — Methylpelletierin, $C_9H_{17}NO$, ist flüssig, leicht löslich in Alkohol, Äther und Chloroform, siedet bei 215°. Das salzsaure Salz zeigt eine Drehung von $[\alpha]_D = +22^0$.

II. Alkaloide der Pyrrolidingruppe.

Es gehören hierher Alkaloide der Solanaceen, Kokaalkaloide und solche der Lupinenarten.

1. Alkaloide der Solanaceen.

In manchen Solanumarten, wie *Atropa belladonna* (Tollkirsche), *Datura strammonium* (Stechapfel), *Hyoscyamus niger* (Bilsenkraut), finden sich mehrere in ihren Eigenschaften und ihrer chemischen Konstitution einander sehr nahe stehende Alkaloide, von denen vor allem die beiden Isomeren:

das optisch-inaktive Atropin $C_{17}H_{23}NO_3$ und
das linksdrehende Hyoscyamin „

zu nennen sind. Es mag hier sogleich erwähnt werden, daß Atropin nichts anderes ist als die razemische Modifikation des Hyoscyamins, wie insbesondere aus den der Neuzeit entstammenden Untersuchungen von *Gadamer* und *Amenomiya*[1]) hervorgeht.

Atropin.

r-Tropasäure-i-tropinester.

```
CH2———————CH———————CH2
|          |         |
|         N.CH3      CH.O.CO—CH—C6H5
|          |         |          |
CH2———————CH———————CH2         CH2.OH.
```

Vorkommen, Gewinnung und Eigenschaften desselben.

Die Base kommt in der Tollkirsche (Atropa belladonna), dem Stechapfel (Datura strammonium) sowie in der Wurzel von Scopolia japonica vor.

Zur Extraktion derselben aus Atropa belladonna wird folgendes Verfahren, das auf den Arbeiten von *Rabourdin, Gerrard, Pesci, Procter* u. a. beruht, empfohlen. Zwei- bis dreijährige, völlig trockene und fein gepulverte Belladonnawurzel wird zweimal mit 90%igem Alkohol unter gelindem Erwärmen ausgezogen. Die filtrierten alkoholischen Extrakte versetzt man

[1]) *Gadamer* und *Amenomiya*, Die Beziehungen des Hyoscyamins zu Atropin und des Skopolamins zu i-Skopolamin. Arch. d. Pharm. Bd. **239**. S. 294, 321 (1901); Bd. **240**. S. 498 (1902).

mit wenig — ungefähr 4% des in Arbeit genommenen Wurzelpulvers — gelöschtem Kalk, läßt 24 Stunden stehen und filtriert. Das Filtrat wird bis zur schwach sauren Reaktion mit verdünnter Schwefelsäure versetzt. Man läßt das Calciumsulfat absetzen, dekantiert und destilliert den Alkohol im Wasserbade ab. Nach Befreien des sauren Destillationsrückstandes durch Schütteln mit Äther oder Petroläther von Harz und Fett versetzt man mit Kaliumkarbonatlösung bis zur schwach alkalischen Reaktion, d. h. bis zur beginnenden Trübung. Nach 24stündigem Stehen haben sich die letzten Verunreinigungen als harzige, aber atropinfreie Masse ausgeschieden. Aus dem Filtrate wird das Atropin durch Übersättigen mit Kaliumkarbonat ausgefällt. Die nach 24stündigem Stehen vollständig abgeschiedene Rohbase wird abgepreßt, zwischen Filtrierpapier getrocknet, in wenig Wasser verteilt, nochmals abgepreßt, hierauf in Alkohol gelöst und mit Tierkohle entfärbt, die Lösung filtriert und eingeengt. Auf Zusatz von ca. dem sechsfachen Volumen Wasser scheidet sich das Atropin nach längerem Stehen in kristallinischen, konzentrisch gruppierten Krusten ab. Der Atropingehalt verschiedener Pflanzenteile wechselt je nach der Wachstumsperiode sehr beträchtlich. Nach *Mein*[1]) enthalten 1000 Teile getrockneter Belladonnawurzel etwa 3·3 Teile Atropin.

Das Atropin ist optisch inaktiv, kristallisiert aus Alkohol und Chloroform in Prismen vom Schmelzpunkt 115—116°. Seine Lösungen schmecken scharf und bitter, es ist ein starkes Gift und verdankt seine weitverbreitete medizinische Anwendung seiner Eigenschaft, die Pupille zu erweitern (Mydriasis). Es vermag den durch Muskarin hervorgerufenen Stillstand des Herzens zu heben.

Das inaktive Atropin entsteht auch, wie *Will*[2]) und *Schmidt*[3]) gefunden haben, aus seinem Stereoisomeren, dem Hyoscyamin, beim Erhitzen desselben unter Luftabschluß auf 110° oder aus seiner alkoholischen Lösung beim bloßen Stehen durch Zusatz einiger Tropfen Alkali, wie auch schon beim längeren Aufbewahren für sich.[4]) Es ist dies, wie beim Hyoscyamin näher ausgeführt wird, nichts Anderes als eine Razemisierung.

Beim Behandeln mit Salpetersäure[5]) sowie beim Erwärmen mit Essigsäure — resp. Benzoesäureanhydrid oder Phosphorpentoxyd auf 85°[6]) verliert Atropin ein Molekül Wasser und bildet Apoatropin, $C_{17}H_{21}NO_2$, welches mit dem natürlichen Atropamin identisch befunden wurde. Dasselbe

[1]) *Mein*, Über die Darstellung des Atropins in weißen Kristallen. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **6**. S. 67 (1833).

[2]) *Will*, Atropin und Hyoscyamin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 1717; *Will* und *Bredig*, Umwandlung von Hyoscyamin in Atropin durch Basen. Zur Kenntnis der Massenwirkung. S. 2777 (1888).

[3]) *Schmidt*, Umwandlung von Hyoscyamin in Atropin. Ebenda. 1829.

[4]) *O. Hesse*, Zur Kenntnis einiger Solonaceenalkaloide. Atropin. Ann. d. Chem. Bd. **309**. S. 75.

[5]) *Pesci*, Gaz. chim. ital. Vol. **11**. p. 538 (1881); Vol. **12**. p. 60 (1882).

[6]) *O. Hesse*, Zur Kenntnis der Atropa-Alkaloide. Ann. d. Chem. Bd. **277**. p. 292 (1894).

kristallisiert in Prismen vom Schmelzpunkt 60 bis 62° und zeigt keine Mydriasis. Erhitzt man Atropin auf 130°, so erfährt dasselbe eine Wasserabspaltung in etwas anderer Richtung, indem sich ein gewisser Anteil in Belladonnin, eine unkristallisierbare, firnisartige Masse, umwandelt.

Die Atropinsalze zeigen nur geringes Kristallisationsvermögen. Das in der Augenheilkunde verwendete *Atropinsulfat*, $(C_{17}H_{23}NO_3)_2H_2SO_4 + H_2O$, wird kristallinisch erhalten, wenn man eine absolut alkoholische Lösung von Schwefelsäure (1 Teil auf 10 Teile Alkohol) in eine Lösung von 10 Teilen Atropin in trockenem Äther eintröpfelt. Das Sulfat scheidet sich hierbei in Nadeln aus. — Das *Platinsalz* [1]), $(C_{17}H_{23}NO_3 . HCl)_2PtCl_4$, bildet, durch freiwilliges Verdunsten der verdünnten Lösung bereitet, monokline Tafeln, die bei 207—208° unter Zersetzung schmelzen. — Das *Goldsalz* [2]), $(C_{17}H_{23}NO_3 . HCl)AuCl_3$, ist für das Alkaloid charakteristisch. Es fällt meist ölig aus, erstarrt aber bald und läßt sich aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Salzsäure umkristallisieren. Beim Erkalten trübt sich die Lösung und erst nach längerer Zeit beginnt die Ausscheidung kleiner, zu Warzen vereinigter Kristalle. Nach dem Trocknen bildet das Salz ein glanzloses Pulver, das bei 135—137° schmilzt.

Synthese des Atropins.

Beim Kochen mit Barytwasser wird Atropin in Tropin und Tropasäure zersetzt.

$$\underset{\text{Atropin}}{C_{17}H_{23}NO_3} + H_2O = \underset{\text{Tropin}}{C_8H_{15}NO} + \underset{\text{Tropasäure.}}{C_9H_{10}O_3}$$

Die der Gleichung entgegengesetzte Reaktion führte *Ladenburg* [3]) 1879 zur partiellen Synthese des Atropins, er konnte durch Behandeln des tropasauren Tropins mit Salzsäure das Atropin regenerieren.

Die Synthese der Tropasäure wurde von *Ladenburg* und *Rügheimer* [4]) durchgeführt.

Viel später als die Konstitutionserforschung und Synthese der Tropasäure ist diejenige des zweiten Spaltungsproduktes des Atropins, des Alkohols Tropin, gelungen.

Die gesamte Atropinsynthese stellt sich nunmehr in folgender Weise:

---

[1]) *E. Schmidt*, Über die Alkaloide der Belladonnawurzel und des Stechapfelsamens (Atropin, Daturin, Hyoscyamin). Ann. d. Chem. Bd. **208**. S. 196 (1881).

[2]) *Ladenburg*, Die natürlich vorkommenden mydriatisch wirkenden Alkaloide. Ann. d. Chem. Bd. **206**. S. 278 (1881).

[3]) *Ladenburg*, Künstliches Atropin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **12**. S. 941 (1879); Künstliche Alkaloide. Bd. **13**. S. 104 (1880); Die Konstitution des Atropins. Ann. d. Chem. Bd. **217**. S. 78 (1883).

[4]) *Ladenburg* und *Rügheimer*, Künstliche Bildung der Tropasäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **13**. S. 373 (1880); *Spiegel*, Synthese der Tropasäure aus Acetophenon. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **14**. S. 236 (1881); *Kraut* und *Merling*, Additionsprodukte der Atropasäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **14**. S. 330 (1881); *Merling*, Über Additionsprodukte der Atropasäure. Ann. d. Chem. Bd. **209**. S. 3 (1881).

1. Synthese des Glyzerins *(Faraday, Kolbe, Melsens, Boerhave, Friedel* und *Silva)*.

2. Aus Glyzerin: Glutarsäure *(Berthelot* und *de Luca, Cahours* und *Hofmann, Erlenmeyer, Lermantoff* und *Markownikoff)*.

3. Glutarsäure in Suberon *(C. Brown* und *Walker, Boussingault)*.

4. Suberon in Tropidin *(Willstätter)*.

5. Tropidin in Tropin *(Willstätter, Ladenburg)*.

6. Synthese der Tropasäure *(Berthelot, Fittig* und *Tollens, Friedel, Ladenburg* und *Rügheimer)*.

7. Aus Tropin und Tropasäure: Atropin *(Ladenburg)*.

Die Tropeine.[1]

Nach *Ladenburg* bezeichnet man als Tropeine allgemein die Säureester des Tropins. Wir haben im vorhergehenden erwähnt, daß sich die Tropasäure mit diesem Alkohol leicht zu Atropin verbindet. Ähnlich reagieren andere Säuren. Im nachfolgenden seien einige wichtigere Tropeine kurz angeführt.

Homatropin oder Phenylglycolyltropein[2]), $C_{16}H_{21}NO_3$, ist wegen seiner physiologischen Wirkung neben Atropin und Hyoscyamin die wichtigste Verbindung der Tropeingruppe. Sie entsteht aus Tropin und Mandelsäure, kristallisiert aus absolutem Äther in glashellen Prismen, die mit Wasser zerfließlich sind und bei 95·5—98·5° schmelzen. *Hydrobromid* des Homatropins, $C_{16}H_{21}NO_3 . HBr$, kristallisiert in rhombischen Platten und ist in kaltem Wasser nur mäßig löslich.

Nach Untersuchungen von *Völkers*[3]) und seinen Schülern wirkt das Homatropin in Gestalt seines Hydrobromides fast ebenso energisch erweiternd auf die menschliche Pupille ein wie das Atropin, doch verschwindet diese Wirkung verhältnismäßig sehr rasch wieder. Es zeigte sich, daß man bei Einträufelung eines Tropfens einer 1%igen Homatropinlösung in das Auge nach 5—10 Minuten Mydriasis bemerkt, welche nach einer Stunde etwa ihr Maximum (8 *mm*) erreicht und nach 20 Stunden verschwunden ist. Die Atropinwirkung selbst einer sehr schwachen Lösung ($^1/_2$‰) dauert viel länger, etwa 6—9 Tage. Ähnlich verhält es sich mit der Akkommodationslähmung. Es kommt hinzu, daß das Homatropin ein weit schwächeres Gift ist als Atropin und so hat denn das Homatropin Eingang in die Augenheilkunde gefunden.

Pseudoatropin oder Atrolactyltropein[3]), $C_{17}H_{23}NO_3$, mit Atropin isomer, bildet sich durch Behandlung von Atrolactinsäure: $C_6H_5 . C \begin{cases} CH_3 \\ OH \\ CO_2H \end{cases}$ und Tropin mit verdünnter Salzsäure, glänzende, bei 119—120° schmelzende Nadeln, seine mydriatische Wirkung gleicht auffallend der des Atropins.

[1]) *Ladenburg*, Die Konstitution des Atropins. Ann. d. Chem. Bd. **217**. S. 82 (1883).

[2]) *Völkers*, Über Homatropin. Ann. d. Chem. Bd. **217**. S. 86 (1883).

[3]) *Ladenburg*, Die Konstitution des Atropins. Ann. d. Chem. Bd. **217**. S. 82 (1883).

Die Fähigkeit der Tropeine, mydriatisch zu wirken, hängt nach den Untersuchungen von *Ladenburg* und *Völkers* nicht allein vom Vorhandensein des Tropinrestes im Molekül derselben ab. Um sie hervorzurufen, muß der Tropinrest am besten mit einer Oxysäure, welche also ein alkoholisches Hydroxyl enthält, vereinigt sein. Allerdings sind auch Ausnahmen von dieser Gesetzmäßigkeit bekannt.

Hyoscyamin.

l-Tropasäure-i-tropinester.

Das Hyoscyamin wurde 1833 von *Geiger* und *Hesse*[1]) aus dem Bilsenkraut erhalten. Außerdem kommt es noch in verschiedenen anderen Pflanzen vor. So wurde es von *Dunstan* und *Brown*[2]) im Hyoscyamus muticus, von *Thoms* und *Wentzel*[3]) in der Mandragorawurzel aufgefunden. Nach Untersuchungen von *Ernst Schmidt*[4]) und seinen Mitarbeitern enthält die Atropa Belladonna in allen ihren Organen als Mydriatikum im wesentlichen nur Hyoscyamin, und zwar wurden gefunden: in trockenen, reifen Früchten 0·476%, in unreifen Früchten 0·884%, in Kelchen mit jungen Fruchtknoten 0·797%, in reifen Samen des Handels 0·831%, in der Blumenkrone 0·39% Alkaloid.

Seine Eigenschaften sind denen des Atropins sehr ähnlich. Es kristallisiert aus Alkohol in Nadeln vom Schmelzpunkt 108·5°. In seinem scharfen und durchdringenden Geschmack gleicht es dem Atropin, auch seine Wirkung auf die Pupille ist dieselbe: Hyoscyamin bewirkt wie Atropin eine Erweiterung der Pupille. Der Hauptunterschied beider Alkaloide beruht in der optischen Aktivität des Hyoscyamins, welches linksdrehend ist im Gegensatz zu dem inaktiven Atropin; bei $p = 3·22$ und $t = 15$ ist $[\alpha]_D = -20·3$.

Die *Darstellung des Alkaloids aus Mandragorin* z. B. gestaltet sich folgendermaßen. Die zerkleinerte Wurzel wird im Perkolator mit weinsäurehaltigem Alkohol extrahiert, von den vereinigten Auszügen der Alkohol im Vakuum abdestilliert und der nach dem Durchkneten mit Sand verteilte harzige Rückstand mit kaltem Wasser ausgezogen. Die filtrierte wässerige Lösung wird zunächst mit Petroleumbenzin, hierauf mit Äther mehrmals durchgeschüttelt, wobei ein auch in der Belladonnawurzel vorkommender Schillerstoff, die Chrysatropasäure, ein Methyläskuletin, zum größten Teile entfernt wird. Die mit Kaliumkarbonat alkalisierte Lösung gibt sodann beim Schütteln mit Äther das Alkaloid an diesen ab. Aus der ätherischen

[1]) *Geiger* und *Hesse*, Atropin. Ann. d. Chem. Bd. 5. S. 43 (1833).

[2]) *Dunstan* and *Brown*, Vorkommen von Hyoscyamin in dem indischen Hyoscyamus muticus. Journ. chem. Soc. Vol. 75. p. 72 (1899).

[3]) *Thoms* und *Wentzel*, Über Mandragorin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 31. S. 2031 (1898).

[4]) *Ernst Schmidt* und Mitarbeiter, Über die Alkaloide einiger mydriatisch wirkender Solanaceen. Arch. d. Pharm. Bd. 243. S. 303; Über die mydriatisch wirkenden Alkaloide der Samen von Datura alba. S. 309; Über Skopolin. S. 328 (1905).

Lösung wird durch Schütteln mit verdünnter Schwefelsäure das Alkaloid in diese übergeführt, abermals die schwefelsaure Lösung mit Kaliumkarbonat übersättigt und mit Äther ausgeschüttelt. Diese Überführung von Äther in saure, wässerige Lösung wird 5mal wiederholt, wodurch es gelingt, anhängende harzige Bestandteile und den Schillerstoff aus dem Alkaloid zu beseitigen. Nach dem Abdunsten der ätherischen Lösung des Alkaloids im Vakuum hinterbleibt ein nur schwach gelb gefärbter Sirup, der über Schwefelsäure zu einer glasartigen festen Masse von schwach narkotischem Geruch eintrocknet.

Die Umwandlung von Hyoscyamin in Atropin (Razemisierung) läßt sich nach *Will* und *E. Schmidt* [1]) durch einfaches Schmelzen sowie nach dem ersteren durch Zufügen kleiner Mengen Alkalien zur alkoholischen Lösung der Base bewerkstelligen. Als Nebenreaktion tritt hierbei hydrolytische Spaltung beider Alkaloide zu i-Tropin und Tropasäure ein. In der Neuzeit hat dann *Gadamer* [2]) gefunden, daß in alkoholischer Lösung Hyoscyamin schon von selbst langsam, fast ohne hydrolytische Spaltung, in Atropin umgewandelt wird, was sich durch Tropinzusatz beschleunigen läßt.

Durch den von *Gadamer* erbrachten Nachweis, daß das Tropin im Hyoscyamin ebenso wie im Atropin inaktiv ist, daß also die Isomerie von Atropin und Hyoscyamin einzig und allein auf die Inaktivität bzw. Aktivität des in diesen Basen enthaltenen Tropasäurerestes zurückzuführen ist, war theoretisch die Überführbarkeit des Atropins in d- und l-Hyoscyamin gegeben. Experimentell ausgeführt wurde diese Umwandlung von *Amenomiya* [3]) dadurch, daß er zunächst käufliches Atropin in Tropin und r-Tropasäure verseifte, letztere nach dem Verfahren von *Ladenburg* und *Hundt* [4]) in d- und l-Tropasäure zerlegte und schließlich das Tropin wieder mit d- oder l-Tropasäure vereinigte.

Auch die vollständige Synthese des Hyoscyamins ist nunmehr durchführbar. Sie gestaltet sich analog derjenigen des Atropins, nur ist die Tropasäure vor der Vereinigung mit Tropin in die aktiven Komponenten zu spalten.

Die von *Cushny* [5]) ausgeführte Untersuchung über die pharmakologische Wirkung des Atropins, d- und l-Hyoscyamins hat Ergebnisse geliefert, welche in Einklang stehen mit der Annahme, daß Atropin razemisches Hyoscyamin ist.

---

[1]) *Will* und *E. Schmidt,* Atropin und Hyoscyamin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 1717; *Will* und *Bredig,* Umwandlung von Hyoscyamin in Atropin durch Basen. Zur Kenntnis der Massenwirkung. S. 2797 (1888).

[2]) *J. Gadamer,* Die Beziehungen des Hyoscyamins zu Atropin und des Skopolamins zu i-Skopolamin. Arch. d. Pharm. Bd. **239**. S. 294, 321 (1901).

[3]) *Amenomiya,* Überführung des Atropins in d- und l-Hyoscyamin. Arch. d. Pharm. Bd. **240**. S. 498 (1902).

[4]) *Ladenburg* und *Hundt,* Darstellung optisch aktiver Tropasäure und optisch aktiver Atropine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **22**. S. 2590 (1889).

[5]) *Cushny,* Atropin und Hyoscyamin. Eine Untersuchung über die Wirkung von optisch Isomeren. Journ. of Physiol. Vol. **30**. p. 176 (1903).

Durch wasserentziehende Mittel wird das Hyoscyamin in Atropamin und Belladonnin übergeführt, welche Alkaloide auch bei der analogen Behandlung des Atropins entstehen.[1])

Die beiden Solanaceenalkaloide **Hyoscin** und **Skopolamin** (Atroscin) von der Formel $C_{17}H_{21}NO_4$, deren Konstitution noch nicht vollständig aufgeklärt ist, sind optisch isomer. Das Hyoscin läßt sich in Skopolamin überführen. Letzteres liefert bei der Hydrolyse Tropasäure und Skopolin, ist also Tropasäure-skopolinester. Das Skopolin, $C_8H_{13}NO_2$, zeigt große Ähnlichkeit mit dem Tropin, $C_8H_{15}NO$. Der wesentliche Unterschied beider besteht in dem Ersatz zweier Wasserstoffatome des Tropins gegen ein Sauerstoffatom im Skopolin. Dasselbe ist nicht in Form von Wasser abspaltbar und befindet sich wahrscheinlich in ätherartiger Bindung. Man wird also nicht fehlgehen in der Annahme, daß Skopolin dem Tropin ähnlich konstituiert ist und wie dieses einen Pyrrolidinring enthält.

Die physiologische Wirkung des Hyoscins und Skopolamins ist beruhigend, ohne schädliche Nebenreaktionen wie beim Atropin; auch die mydriatische Wirkung übertrifft die des Atropins um das Mehrfache. Das Skopolamin ist dem Hyoscin vorzuziehen.

Zur *Darstellung von Skopolamin* benutzt man die bei der Hyoscyamingewinnung aus dem Hyoscyamussamen oder den Blättern resp. Wurzeln von Duboisia myoporoides abfallenden Mutterlaugen. Nach dem Auskristallisieren des Hyoscyamins erhält man durch weiteres Verdampfen die sog. amorphen Hyoscyamusrohbasen, deren salzsaure Lösung mit Goldchlorid ausgefällt wird. Durch Umkristallisieren des zuerst sich ausscheidenden Goldsalzes werden bei 198—199° schmelzende Prismen erhalten. Man fällt aus der wässerigen Lösung derselben das Gold mit Schwefelwasserstoff, erhält aus dem Filtrat durch Eindampfen das salzsaure Salz und schließlich die Base selbst. Das in Deutschland offizinelle Hydrobromid, $C_{17}H_{21}NO_4 . HBr_2 + 3 H_2O$, löst sich in 4 Teilen Wasser von 15° und wird in der Therapie der Augenkrankheiten und bei gewissen Nervenaffektionen angewandt.

Die von *E. Schmidt*[2]) und seinen Mitarbeitern ausgeführte Untersuchung über den Alkaloidgehalt einiger Daturaarten, hat als wichtigstes Ergebnis die Erkenntnis geliefert, daß Datura Metel eine typische Skopolaminpflanze ist. Sie enthält in ihren krautigen Teilen als Hauptalkaloid reines l-Skopolamin. *E. Schmidt* weist besonders auf die praktische Bedeutung hin, welche demzufolge Datura Metel hat, da nach den Untersuchungen von *R. Kobert* reines l-Skopolamin den Augenärzten dringend zur Benutzung empfohlen wird.

---

[1]) *O. Hesse*, Zur Kenntnis der Atropa-Alkaloide. Ann. d. Chem. Bd. **277**. S. 290 (1893); *E. Schmidt*, Über das Skopolamin. Arch. d. Pharm. Bd. **232**. S. 409.

[2]) *E. Schmidt* und Mitarbeiter, Über die Alkaloide einiger mydriatisch wirkender Solanaceen. Arch. d. Pharm. Bd. **243**. S. 303; Über die mydriatisch wirkenden Alkaloide der Samen von Datura alba. S. 309; Über Skopolin. S. 328 (1905).

Atropamin oder Apoatropin.

Atropasäure-tropinester:

$$\begin{array}{lllll}
H_2C & — CH — & CH_2 & & CH_2 \\
 & \quad | & \;| & & \;| \\
| & N.CH_3 & CH.O.CO.C.C_6H_5. & & \\
| & \quad | & & & \\
H_2C & — CH — & CH_2 & &
\end{array}$$

Das Atropamin oder Apoatropin, welches ein Molekül Wasser weniger enthält als Atropin, wurde zuerst von *Pesci*[1]) dargestellt durch Behandeln von Atropin mit Salpetersäure. Das Alkaloid entsteht stets aus dem Atropin oder Hyoscyamin bei der Einwirkung wasserentziehender Mittel, wie Schwefelsäure, Anhydride der Phosphorsäure, Essigsäure etc.[2]) Es wird auch zeitweise in der Wurzel der Tollkirsche angetroffen, in welchem Falle es sich dann in den Mutterlaugen von der Atropindarstellung findet.[3]) Es kristallisiert aus ätherischer Lösung in Prismen vom Schmelzpunkt 60—62°, besitzt keine mydriatischen Eigenschaften und ist optisch inaktiv.

Beim Erhitzen wird das Atropamin in sein Isomeres, das Belladonnin, umgelagert. Auch beim Erwärmen mit Salzsäure, beim Auflösen in konzentrierter Schwefelsäure, beim Kochen mit Alkalien und Barytwasser tritt diese Umlagerung ein. Gleichzeitig spaltet sich dabei ein Teil des Alkaloids in Tropin und Atropasäure:

$$\underset{\text{Apoatropin}}{C_{17}H_{21}NO_2} + H_2O = \underset{\text{Tropin}}{C_8H_{15}NO} + \underset{\text{Atropasäure.}}{C_9H_8O_2}$$

Durch Umkehrung dieser Reaktion konnte *Ladenburg*[4]) eine partielle Synthese des Atropamins erzielen, indem er ein Gemenge von Tropin und Atropasäure mit Salzsäure erhitzte. Nachdem nunmehr das Tropin und die Atropasäure synthetisch zugänglich sind, ist in der Neuzeit die vollständige Synthese des Apoatropins möglich geworden.

Das Hydrochlorid des Apoatropins, $C_{17}H_{21}NO_2 . HCl$, kristallisiert in Blättchen, die bei 237—239° schmelzen. — Das Hydrobromid, $C_{17}H_{21}NO_2 . HBr$, schmilzt bei 230—231°. — Das Goldsalz, $(C_{17}H_{21}NO_2 . HCl)AuCl_3$, bildet Nadeln, die bei 110—112° schmelzen. — Das Platinsalz, $(C_{17}H_{21}NO_2 . HCl)_2PtCl_4$, kristallisiert in Schüppchen vom Schmelzpunkt 212—214°.

Belladonnin.[5])

Dasselbe ist wahrscheinlich ein Stereoisomeres des Atropamins. Es findet sich in sehr geringer Menge in der Tollkirsche (0·01—0·04%) und

[1]) *Pesci*, Darstellung von Atropamin. Gaz. chim. ital. Vol. **11**. p. 538 (1881); Vol. **12**. p. 60 (1882).

[2]) *O. Hesse*, Zur Kenntnis der Atropa-Alkaloide. Annal. d. Chem. Bd. **277**. S. 290 (1893).

[3]) *O. Hesse*, Annal. d. Chem. Bd. **261**. S. 87 (1891).

[4]) *Ladenburg*, Die Konstitution des Atropins. Annal. d. Chem. Bd. **217**. S. 290.

[5]) *Merling*, Über Belladonnin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **17**. S. 381 (1884). — *Hesse*, Annal. d. Chem. Bd. **261**. S. 87 (1891); Zur Kenntnis einiger Solanaceenalkaloide. Bd. **127**. S. 123 (1892); Zur Kenntnis der Atropa-Alkaloide. Bd. **277**. S. 295 (1893).

entsteht, wie oben erwähnt, aus seinem Isomeren, dem Atropamin, durch Erhitzen sowie durch Einwirkung von Säuren oder Ätzbaryt. Man kann auch direkt vom Atropin zum Belladonnin gelangen, nämlich durch Erhitzen des Atropins auf 130° oder durch Auflösen desselben in konzentrierter Schwefelsäure und kurzes Stehen der Lösung.

Bei der Hydrolyse liefert es schließlich dieselben Verbindungen wie das Atropamin, also Atropasäure und Tropin.

Das Belladonnin bildet eine unkristallisierbare, firnisartige Masse, deren Einheitlichkeit von verschiedenen Forschern noch in Zweifel gezogen wird. Es löst sich leicht in Alkohol, Äther, Chloroform und Benzol, wenig in Wasser.

2. Alkaloide der Kokablätter.

Die Blätter von *Erythroxylon Coca* enthalten eine größere Anzahl von Alkaloiden. Es sind außer den weniger wichtigen Hygrinen die folgenden:

Kokain	$C_{17}H_{21}NO_4$
Cinnamylkokain	$C_{19}H_{23}NO_4$
α-Truxillin	$(C_{19}H_{23}NO_4)_2$
β-Truxillin	$(C_{19}H_{23}NO_4)_2$
Benzoylecgonin	$C_{16}H_{19}NO_4$
Tropakokain	$C_{15}H_{19}NO_2$

Alle diese Alkaloide sind Propanderivate, enthalten also den Pyrrolidinkern. Sie liefern mit Ausnahme von Tropakokain alle ein und dasselbe Spaltungsprodukt, nämlich Ecgonin, und stehen, wie schon mehrmals erwähnt, in naher Beziehung zu den Solanaceenalkaloiden.

Von allen Kokaalkaloiden besitzt nur das l-Kokain therapeutischen Wert, die anderen sind ohne besondere physiologische Wirkung. Doch kann man diese unwirksamen Nebenalkaloide, da sich aus ihnen nach *Liebermann* l-Ecgonin gewinnen läßt (siehe S. 931), jetzt auch nutzbar machen.

Kokaine.

Benzoylecgoninmethylester:

```
H2C ——— CH ——— CH.COOCH3
 |      |       |
 |     N.CH3   CH.O.COC6H5
 |      |       |
H2C ——— CH ——— CH2
```

Entsprechend den verschiedenen stereoisomeren Ecgoninen existieren auch drei stereoisomere Kokaine, nämlich l-Kokain, d-Kokain (d-ψ-Kokain) und r-Kokain; dazu kommt noch das vom α-Ecgonin sich ableitende strukturisomere α-Kokain.

Unter diesen stellt das l-Kokain das wertvollste und wichtigste dar. Es ist ein geschätztes lokales Anästhetikum und wird wegen der kurzen

Dauer seiner Wirkungen namentlich in der Therapie der Augenkrankheiten und in der zahnärztlichen Praxis angewandt. Zu länger andauernder Anästhesie kann es wegen seiner Giftigkeit nicht benutzt werden. Es kommt als Hydrochlorid zur Verwendung.

Vorkommen, wichtige Spaltungen und Darstellung des l-Kokains.

Das l-Kokain wurde im Jahre 1860 von *Niemann*[1]) aus den peruanischen Kokablättern aus Erythroxylon coca isoliert.

Schon durch Kochen mit Wasser wird es in Methylalkohol und Benzoylecgonin gespalten[2]):

$$\underset{\text{Kokain}}{C_{17}H_{21}NO_4} + H_2O = \underset{\text{Benzoylecgonin.}}{C_{16}H_{19}NO_4} + CH_3OH$$

Bei kräftigerer Hydrolyse durch Mineralsäuren, Barytwasser oder Alkalilaugen entstehen, indem das Benzoylecgonin weiter zerlegt wird, l-Ecgonin, Benzoësäure und Methylalkohol[3]):

$$\underset{\text{Kokain}}{C_{17}H_{21}NO_4} + 2H_2O = \underset{\text{Ecgonin}}{C_9H_{15}NO_3} + \underset{\text{Benzoësäure}}{C_7H_6O_2} + \underset{\text{Methylalkohol.}}{CH_3OH}$$

Aus diesen Spaltungen konnte geschlossen werden, daß das Kokain Benzoylecgoninmethylester ist und es lag der Gedanke nahe, es aus dem Ecgonin darzustellen.

Die so angeregte partielle Synthese des l-Kokains wurde zuerst von *Merck*[4]) ausgeführt durch Erhitzen von l-Ecgonin mit Benzoësäureanhydrid und Jodmethyl:

$$\underset{\text{Ecgonin}}{C_8H_{13}N\begin{cases}COOH\\OH\end{cases}} + (C_6H_5CO)_2O + CH_3J =$$

$$\underset{\text{Kokain.}}{C_8H_{13}N\begin{cases}COOCH_3\\O.COC_6H_5\end{cases}} + HJ + C_6H_5.COOH$$

Auch nach anderen Methoden der Esterifizierung läßt sich die Überführung von Ecgonin in Kokain bewerkstelligen.[5]) Nach *Liebermann*[6])

[1]) *Niemann*, Über das Kokain. Annal. d. Chem. Bd. **114**. S. 218 (1860).

[2]) *Paul*, Pharmaceutical Journal. Vol. **3**. p. 325. — *Einhorn*, Kokain. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 47 (1888).

[3]) *Lossen*, Über das Kokain. Annal. d. Chem. Bd. **133**. S. 351. — *Calmels* und *Gossin*, Comptes rendus de l'Acad. des sciences de Paris. T. **132**. p. 971.

[4]) *Merck*, Künstliches Kokain. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 2264; Über die künstliche Darstellung von Kokain und seinen Homologen. S. 2952 (1885).

[5]) *Einhorn*, Über die technische Darstellung des Kokains aus seinen Nebenalkoloiden. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 47; *Einhorn* und *Klein*, Einwirkung von Säurechloriden auf salzsaure Ecgoninmethylester. S. 3335 (1888); Ref. Bd. **22**. S. 619 (1889); Technische Darstellung des Kokains aus den Nebenalkaloiden. Bd. **27**. S. 1523; Über die technische Darstellung des Kokains aus seinen Nebenalkaloiden. S. 2960; Darstellung von Isoeugenol aus Eugenol. Ref. S. 957 (1894).

[6]) *Liebermann*, Über eine neue technische Darstellung und teilweise Synthese des Kokains. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 3196 (1888); Zur Abhandlung von *Einhorn* und *Willstätter*, Über die technische Darstellung von Kokain aus seinen Nebenalkaloiden. Bd. **27**. S. 2051 (1894).

verläuft dieselbe in guter Ausbeute, wenn man l-Ecgonin durch Einwirkung von Benzoësäureanhydrid in konzentrierter wässeriger Lösung zunächst in l-Benzoylecgonin überführt und letzteres mit Methylalkohol und Salzsäure oder Schwefelsäure methyliert. Dieses Verfahren gewinnt erhöhte Bedeutung dadurch, weil so das aus den medizinisch unbrauchbaren Kokanebenalkaloiden darzustellende l-Ecgonin nutzbar gemacht und in l-Kokain übergeführt werden kann. So gewinnt man eine größere Menge von reinem l-Kokain, als überhaupt ursprünglich in der Pflanze gebildet war.

Die Isolierung des l-Kokains aus den Kokablättern geschieht mit Hilfe von hochsiedendem Petroleumäther nach der Methode von *Bignon*. Die gepulverten Kokablätter werden unter mäßigem Erwärmen und beständigem Schütteln mit einem Gemisch von verdünnter Sodalösung und Petroleumäther (Siedepunkt 200—250°) behandelt, wobei der letztere die abgeschiedenen Basen aufnimmt. Die Masse wird alsdann abgepreßt und die geklärten Flüssigkeitsschichten werden getrennt. Man neutralisiert die Petroleumätherlösung mit verdünnter Salzsäure und erhält so das rohe Kokainchlorhydrat in Form eines weißen Niederschlages, der abgepreßt und getrocknet wird. Die letzten gelöst bleibenden Anteile der Base gewinnt man durch Verdampfen der wässerigen Flüssigkeit.

Die Isolierung der Rohbase aus der Droge wird an Ort und Stelle ausgeführt, und das Chlorhydrat der Rohbase gelangt aus Amerika in die europäischen Fabriken, in denen die weitere Verarbeitung auf reine Base respektive deren Salze vorgenommen wird. In den besten Qualitäten der Rohbase finden sich bis zu 94% reines l-Kokain vom Schmelzpunkt 98°, in den minderwertigen nur ca. 78—79%. Die Rohbase enthält Rechtskokain, Benzoylecgonin, Cinnamylkokain, Hygrin, Truxilline und noch unbekannte Säurederivate des Ecgoninesters.

d-Kokain (d-ψ-Kokain, welches, wie erwähnt, das gewöhnliche l-Kokain begleitet und in den bei dessen Darstellung abfallenden Nebenprodukten zu finden ist, kann in analoger Weise wie das l-Kokain aus dem d-Ecgonin durch Esterifizierung mit Methylalkohol und darauf folgende Benzoylierung erhalten werden.

Durch Esterifizierung des d-Ecgonins mit anderen Alkoholen stellten *Einhorn* und *Marquardt* verschiedene andere Ecgoninester dar, und aus denselben durch Benzoylierung die entsprechenden homologen d-Kokaine. Mit Ausnahme des Benzoyl-d-ecgoninäthylesters,

$$C_8 H_{13} (O . C_7 H_5 O) (CO_2 . C_2 H_5) N,$$

welcher bei 75° schmilzt, sind alle diese Körper Öle, die nicht kristallisiert erhalten werden konnten.

r-Kokain ist auf vollkommen synthetischem Wege von *R. Willstätter*[1]) hergestellt worden. Der Methylester des r-Ecgonins läßt sich glatt benzoylieren und so in r-Kokain überführen. Die Spaltung

[1]) *R. Willstätter*, Synthesen in der Tropingruppe. Synthese von r-Kokain. Annal. d. Chem. Bd. 326. S. 42 (1903).

desselben in optische Antipoden ist bisher nicht gelungen. In Wasser ist das synthetische Kokain so gut wie unlöslich, in absolutem Alkohol und Äther auch in der Kälte äußerst leicht löslich. Es besitzt bitteren Geschmack und ruft auf der Zunge genau wie das gewöhnliche Alkaloid ein intensives pelziges Gefühl hervor. Es bewirkt ausgesprochene Anästhesie und besitzt (wie gewöhnliches Kokain) bei subkutaner Einverleibung toxische Eigenschaften.

α-Kokain ist mit den vorstehend beschriebenen Kokainen strukturisomer, indem es im Gegensatz zu diesen die Karboxymethyl- und Benzoylhydroxylgruppe am nämlichen Kohlenstoffatom 3 des Tropankernes gebunden enthält.

```
H2 C———CH———CH2
|       |      |
|     N.CH3   C<O.COC6 H5
|       |      \COOCH3
|       |      |
H2 C———CH———CH2
```

α-Kokain.

Es leitet sich ab vom α-Ecgonin und wurde von *Willstätter*[1]) aus diesem durch Esterifizierung und Benzoylierung mit Hilfe der Methoden, welche zum Aufbau des l-Kokains aus seinen Spaltungsprodukten gedient haben, erhalten. Die anästhesierende Wirkung des l-Kokains fehlt diesem Isomeren völlig.

Cinnamylkokaine.

Cinnamylecgoninmethylester:

```
H2 C———CH———CH.COO CH3
|
|      N.CH3   CH.O.CO.CH:CH.C6 H5.
|        |       |
H2 C———CH———CH2
```

Das l-Cinnamylkokain findet sich in fast allen Kokavarietäten, besonders in der von Java. Es wurde von *Giesel*[2]) im Rohkokain nachgewiesen, von *Liebermann*[3]) untersucht und aus dem l-Ecgonin dargestellt durch Einwirkung von Zimtsäureanhydrid und darauffolgende Esterifizierung des Cinnamylderivates mit Methylalkohol und Salzsäure. Es kristallisiert aus der heißen Benzol-Ligroinlösung in Nadeln, die bei 121° schmelzen.

3. Alkaloide der Lupinenarten.

Spartein und Lupinin.

Das Spartein $C_{15}H_{26}N_2$ wurde im Jahre 1851 von *Stenhouse* im Besenginster entdeckt. Um dasselbe darzustellen, werden die Pflanzenteile

[1]) *R. Willstätter*, Über ein Isomeres des Kokains. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 29. S. 2216 (1896).

[2]) *Giesel*, Cinnamylkokain. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 22. S. 2661 (1889).

[3]) *Liebermann*, Annal. d. Chem. Bd. 241. S. 3373 (1888).

mit schwefelsäurehaltigem Wasser ausgezogen, die Lösung konzentriert und mit Natronlauge destilliert. Das Destillat wird mit überschüssiger Salzsäure eingedampft und der Rückstand mit festem Kali destilliert. Das übergegangene Öl wird durch Erhitzen mit Natrium von den letzten Spuren Wasser befreit und dann im Wasserstoffstrom destilliert. 75 *kg* Pflanze liefern ca. 22 cm^3 Spartein.

Es ist ein farbloses Öl, das bei 311—311·5° (723 *mm*) oder bei 180—181° (20 *mm*) siedet. Das Drehungsvermögen in alkoholischer Lösung ist $[\alpha]_D = -14·6°$. Die Lösungen des stark narkotisch wirkenden Alkaloids reagieren deutlich alkalisch. In seinen toxischen Wirkungen nähert es sich teils dem Coniin, teils dem Nikotin.

Die Konstitution des Sparteins steht noch keineswegs fest, es scheint aber, daß es den Pyrrolidinkern enthält.

Bei einer Untersuchung über die Ursache der Lupinenkrankheit der Schafe isolierte *G. Liebscher* aus dem Samen der gelben Lupine zwei Alkaloide: das sauerstoffhaltige kristallisierende Lupinin und das sauerstofffreie flüssige Lupinidin. Letzteres erwies sich bei näherer Untersuchung durch *Willstätter* und *Marx*[1]) als identisch mit Spartein.

Unsere Kenntnis von dem Alkaloidgehalt der verschiedenen Lupinenarten, den *E. Schmidt*[2]) und seine Schüler gründlich untersucht haben, ist hierdurch wesentlich vereinfacht und geklärt. Es kommen vor:

1. Lupinin, $C_{10}H_{19}ON$, in Lupinus luteus und Lupinus niger.
2. Spartein, $C_{15}H_{26}N_2$, in Lupinus luteus, Lupinus niger.
3. Lupanin, $C_{15}H_{24}ON_2$, und zwar in razemischer und linksdrehender Form, in Lupinus albus, Lupinus angustifolius, Lupinus perennis.

Die Auffindung des Sparteins in der gelben Lupine bietet auch praktisches Interesse im Hinblick auf die Lupinenkrankheit der Schafe, deren Ursachen noch nicht genügend aufgeklärt worden sind.

Zur Verarbeitung auf die Alkaloide extrahiert man die Lupinenkörner mit salzsäurehaltigem Alkohol (95% mit 1%iger HCl). Nach dem Abdestillieren der Hauptmenge des Alkohols wird von Fett und anderen unlöslichen Substanzen abfiltriert, das Filtrat mit Natriumhydroxyd neutralisiert und zur Sirupkonsistenz eingedampft. Nach abermaligem Filtrieren wird der gelbbraune Extrakt mit Natronlauge stark alkalisch gemacht und ausgeäthert. Die alkaloidhaltigen, von Äther befreiten Extrakte werden mit Salzsäure und konzentrierter Quecksilberchloridlösung versetzt, so lange ein Niederschlag entsteht. Hierdurch wird das Spartein ausgefällt. Man filtriert das Quecksilberdoppelsalz ab, fällt im Filtrat das Quecksilber

[1]) *Willstätter* und *Marx*, Lupinidin und Spartein. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 37. S. 2351 (1904).

[2]) *E. Schmidt* und Mitarbeiter, Über die Alkaloide der Lupinensamen. Arch. d. Pharm. Bd. 235. S. 192 (1897); Über die Lupinenalkaloide. Bd. 242. S. 409 (1904). — *Bergh*, Über die Alkaloide der Lupinenarten. Ebenda. S. 416. — Man vgl. auch *E. Schulze*, Einige Notizen über das Lupeol. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41. S. 474 (1904).

mittelst Schwefelwasserstoff und dampft das Filtrat, welches das salzsaure Lupin enthält, zur Trockene. Im Abdampfrückstand wird die Base mit Natronlauge in Freiheit gesetzt und mit Äther gesammelt. Durch Umkristallisieren aus Petroläther erhält man das Lupinin in weißen Kristallen, die bei 67° bis 68° schmelzen. Im Wasserstoffstrome erhitzt, siedet die Base bei 255° bis 257°. Sie hat einen angenehm fruchtartigen Geruch und intensiv bitteren Geschmack.

III. Alkaloide der Chinolingruppe.

1. Chinaalkaloide.

Chinin und Cinchonin:

```
                                H2C——CH        CH.CH:CH2
                                 |    |            |
       HC    C.OCH3              |   CH2           |
      HC//     \\CH              |    |            |
       C———C                     |   CH2           |
      N\\      \C — CH — HC——————N————————CH2
       HC    CH      OH
```

Chinin[1])

```
                                H2C      CH        CH.CH:CH2
                                          |
       HC    CH                          CH2
      HC//     \\CH              |        |
       C      /C                         CH2
      N\\      C    CH — HC——————N————————CH2
       HC    CH     OH
```

Cinchonin[1])

Von verschiedenen, besonders in Bolivia und Peru vorkommenden Chinchonaarten: Chinchona Calisaya, C. lancifolia, C. Pitagensis u. a. Rubiaceen, stammt die Chinarinde her. Sie enthält außer einem Gerbstoff eine Reihe von Alkaloiden in Form von Salzen der Chinasäure, Chinagerbsäure und Chinovasäure. Von denselben sind das Chinin $C_{20}H_{24}N_2O_2$ und Cinchonin $C_{19}H_{22}N_2O$ die wichtigsten. Das Chinin, das häufig mit drei Molekülen Wasser kristallisiert, schmilzt wasserfrei bei 177° und bildet, aus Alkohol und Äther kristallisiert, seideglänzende Nadeln. Das Cinchonin bildet durchsichtige Prismen oder Nadeln, die bei 220° zu sublimieren beginnen

[1]) Wir geben hier die Formeln wieder, welche *Rabe* aus seinen in der Neuzeit ausgeführten Untersuchungen abgeleitet hat. Man vgl. *P. Rabe,* Über die Konstitution des Cinchonins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 62 (1908).

und erst bei 255·4° schmelzen. Bei der Chinindarstellung aus Chinarinde führt man die in dieser enthaltenen Basen zunächst in Sulfate über. Letztere lassen sich dann auf Grund der verschiedenen Löslichkeit in Alkohol und in Wasser voneinander trennen. Chininsulfat ist in den genannten Lösungsmitteln schwer, Cinchoninsulfat dagegen leicht löslich, so daß es in den Mutterlaugen von der Chinindarstellung angereichert wird. Fällt man letztere mit Natronlauge, so entsteht ein Niederschlag, der aus viel Cinchonin und wenig Chinin etc. besteht. Durch Behandeln mit Alkohol, in dem das Cinchonin schwer löslich ist, kann ihm das Chinin entzogen werden. Das Cinchonin wird wieder in Sulfat übergeführt, letzteres durch Umkristallisieren gereinigt, mit Ammoniak zerlegt und das Cinchonin aus Alkohol umkristallisiert.[1]) Um Cinchonin aus Gemengen von Chinin und Cinchonin, in welchen das letztere vorwiegt, rein darzustellen, läßt sich auch die Schwerlöslichkeit des Cinchonins in Alkohol und in Äther benutzen. Das Cinchonin bildet also ein Nebenprodukt bei der Chinindarstellung. Da die Chininpräparate in bezug auf therapeutische Bedeutung denen aus Cinchonin weit überlegen sind, so ist das Cinchonin viel billiger als das Chinin.

Das Drehungsvermögen des Cinchonins ist von der Natur des Lösungsmittels und von dem Vorhandensein einer Säure beeinflußt. Für eine absolut alkoholische Lösung (0·1 bis 0·15 *g* in 20 *cm*³ gelöst) wurde gefunden $[\alpha]_D = + 223·2°$. Die Cinchoninlösungen besitzen, abweichend von denen des Chinins, keine Fluoreszenz.

Zur Darstellung des Chinins aus Chinarinde wird diese mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure wiederholt ausgekocht und die Lösung mit Kalk oder Natriumhydroxyd gefällt. Der Niederschlag wird in 75—80%igem Weingeist gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert und der Alkohol abdestilliert. Das ausgeschiedene Sulfat wird von der Mutterlauge getrennt und wiederholt aus Wasser umkristallisiert, wobei, wie vorstehend erwähnt, das Chininsulfat zunächst auskristallisiert, während die Sulfate der übrigen Chinabasen in Lösung bleiben. Ist die Rinde sehr cinchoninhaltig, so wird der durch Alkali erhaltene Niederschlag mit 85- bis 90%igem Alkohol ausgekocht, wobei beim Erkalten das in Alkohol schwerer lösliche Cinchonin zum Teil sich ausscheidet. Erst dann wird mit Schwefelsäure neutralisiert. Für die Trennung kleinerer Mengen Chinin und Chinchonin läßt sich auch die Schwerlöslichkeit des letzteren in Äther benutzen. Aus der Lösung des schwefelsauren Chinins in verdünnter Schwefelsäure fällt Ammoniak amorphes, wasserfreies Chinin aus. Ein sehr reines Chinin wird durch Zerlegen des Jodsulfats (Herapathits) mit Schwefelwasserstoff gewonnen.

Conchinin oder Chinidin:

$C_{20}H_{24}N_2O_2$.

Dieses Stereoisomere des Chinins findet sich in den meisten echten Chinarinden, namentlich aber in den Rinden von Cinchona pitagensis,

[1]) *Hesse*, Über Cinchonin. Ann. d. Chem. Bd. 122. S. 227 (1862); Ann. d. Chem. Bd. 225. S. 218 (1884).

Cinchona amygdalifolia und einer auf Java unter dem Namen Cinchona Calisaya kultivierten Cinchone, in letzterer bis zu 3%.

Das Conchinin bleibt bei der Darstellung des Chininsulfats in dessen Mutterlauge und geht schließlich in das Chinoidin über, welch letzteres daher ein geeignetes Material zur Darstellung von Conchinin ist. Aus dem rohen Chinoidin kann das Conchinin gewonnen werden, indem man die alkoholische Lösung desselben mit Jodwasserstoff sättigt: nach einiger Zeit kristallisiert das jodwasserstoffsaure Conchinin aus. Nach *Hesse*[1]) ist es zweckmäßig, das gepulverte Chinoidin mit Äther zu behandeln, die von demselben aufgenommenen Alkaloide an Schwefelsäure zu binden, die neutrale Lösung zur Beseitigung des etwa vorhandenen Chinins und Cinchonidins mit Seignettesalz auszufällen und das Conchinin aus dem mit Tierkohle behandelten Filtrat mit Jodkalium niedergeschlagen. Das Jodhydrat wird dann mit Ammoniak zersetzt, die Base in essigsaurer Lösung mit Tierkohle entfärbt, mit Ammoniak wieder gefällt und aus kochendem Alkohol umkristallisiert.

Das Conchinin kristallisiert aus weingeistiger Lösung in großen, glänzenden Prismen mit $2^1/_2$ Mol. H_2O, die an der Luft verwittern unter Abgabe von $^1/_2$ Mol. Wasser. Die getrocknete, wasserfreie Base schmilzt bei 172°.

Über die Wirkung des Conchinins liegen Beobachtungen vor aus der Zeit, als der Preis des Chinins sehr hoch war. Man suchte daher nach einem Ersatz für dasselbe und *Jobst* in Stuttgart machte auf das damals wesentlich billigere Conchinin für diesen Zweck aufmerksam. *Macchiarelli* hatte 1878 in italienischen Militärhospitälern bei der Behandlung von Malaria mit Conchinin sehr günstige Resultate erhalten. *v. Ziemsen* und *Freudenberger* wandten Conchinin in der Münchener Klinik in den Jahren 1875—1880 gegen Malaria und Abdominaltyphus an und fanden dasselbe ebenso wirksam wie das Chinin. Nur berichten *Freudenberger* sowie *Strümpell*, daß sich bei den Patienten häufig — etwa $^1/_2$ Stunde nach Darreichung des Conchininsulfats — Erbrechen einstellte.

Von den zahlreichen sonstigen Alkaloiden, die sich in der Chinarinde finden, sei zunächst noch das **Hydrochinin,** $C_{20}H_{26}N_2O_2$, erwähnt. Es kommt in der Chinarinde vor und wurde zuerst von *Hesse* aus den Mutterlaugen des Chininsulfats isoliert. Durch die leichtere Löslichkeit seines Monosulfates kann es von dem Chininsulfat annähernd getrennt werden. Vollkommen kann das Chinin aus einem Gemisch der Sulfate der beiden Basen entfernt werden, indem man die Lösung derselben mit Kaliumpermanganat behandelt. Dabei verbrennt das Chinin, während das Hydrochinin unangegriffen bleibt. Das Hydrochinin kristallisiert aus Chloroform in Nadeln, welche bei 168° schmelzen.

Die physiologische Wirkung des Hydrochinins ist der des Chinins vollkommen gleich, so daß es als ein nützlicher Begleiter der letzteren Base angesehen werden muß.

---

[1]) *Hesse*, Über Conchinin. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **146**. S. 357 (1868).

Cuprein:

```
        CH   COH            H₂C┌───CH────┐CH . CH:CH₂
   HC⟨        ⟩CH              │    CH₂   │
        C──C                   │    CH₂   │
   N⟨        ⟩C────CH────HC────N  ──  CH₂
        HC   CH      OH
```

Das Cuprein, das entmethylierte Chinin, ist 1884 in China cuprea, einer von Remija pedunculata abstammenden Rinde aufgefunden und als Cuprein bezeichnet worden. Es findet sich darin in molekularer Verbindung mit dem Chinin.

Bei der Darstellung des Cupreins verfährt man zunächst wie bei derjenigen des Chinins, löst das Sulfatgemisch in verdünnter Schwefelsäure, übersättigt mit Alkali und zieht das Chinin mit Äther aus. Das Cuprein bleibt als Phenol in der alkalischen Flüssigkeit gelöst. Man säuert dieselbe mit Schwefelsäure an und zerlegt das ausgeschiedene Sulfat mit Ammoniak.

Das Cuprein kristallisiert aus Äther und Alkokol in konzentrisch gruppierten Nadeln, die 2 Mol. H_2O enthalten, bei 120—125° wasserfrei werden und bei 198° schmelzen. Es ist in Äther und Chloroform schwer, in Alkohol leicht löslich. Die alkoholische Lösung reagiert stark basisch und färbt sich auf Zusatz von Eisenchlorid dunkelrotbraun, auf Zusatz von Chlor and Ammoniak intensiv dunkelgrün wie Chinin. Seine schwefelsauren Lösungen fluoreszieren aber im Gegensatz zu denjenigen des Chinins nicht.

Durch Erhitzen mit Chlormethyl (oder besser mit Methylnitrat), Natriummethylat und Methylalkohol im Einschmelzrohr auf 100° wird es in Chinin übergeführt:

$$\underset{\text{Cuprein}}{HO \,.\, C_{19}H_{21}N_2O} + 3\,CH_3J + KOH = \underset{\text{Chininjodmethylat}}{CH_3O \,.\, C_{19}H_{21}N_2O \,.\, 2\,CH_3J} + KJ + H_2O.$$

Hieraus ergibt sich mit aller Sicherheit, daß das Chinin der Methyläther des Cupreins ist; es steht also zu diesem in derselben Beziehung wie das Anisol zum Phenol und wie das Kodein zum Morphin. Vom Cinchonin unterscheidet sich also das Cuprein dadurch, daß es in der Parastellung des Chinolinringes noch eine Hydroxylgruppe enthält.

Indem *Grimaux* und *Arnaud* das Cuprein mit Äthyl-, Propyl- oder Isopropylnitrat oder mit Amylchlorid und den entsprechenden Natriumalkylaten und Alkoholen erhitzten, gewannen sie den Äthyl-, Propyl-, Amyläther des Cupreins: das „Chinäthylin“, „Chinpropylin“, „Chinamylin“.

Die so erhaltenen höheren Alkylderivate des Cupreins wirken noch stärker als Chinin, anscheinend um so stärker, je leichter oxydierbar das am Hydroxyl haftende Alkyl ist, je vollständiger also vermutlich die Verbindung zu Cuprein gespalten wird. Das hat zu dem Schluß geführt[1]).

[1]) *Spiegel*, Chemische Konstitution und physiologische Wirkung. Stuttgart 1909. pag. 82.

daß die geringe febrifuge Wirkung des Cinchonins nicht diesem selbst zukomme, sondern dem Cuprein, dessen Bildung durch Hydroxylierung des Cinchonins in p-Stellung innerhalb des Organismus wahrscheinlich ist.

2. Alkaloide der Strychnosarten.

In den Strychnosarten kommen hauptsächlich drei Alkaloide vor: das Strychnin, das Brucin und das Curarin. Am reichsten an Strychnin und Brucin ist die Brechnuß (Strychnos nux vomica) sowie die Ignatiusbohne, der Samen von Strychnos Ignatii. Die beiden Basen sind nur selten in allen Teilen derselben Pflanze vorhanden. Sie sind wenigstens teilweise an Apfelsäure resp. Kaffeegerbsäure gebunden.

Strychnin.

Es besitzt die von *Regnault* ermittelte Formel $C_{21} H_{22} N_2 O_2$ und bildet trotz des Gehaltes an zwei Stickstoffatomen nur mit einem Äquivalent Säure beständige Salze.

Der Abbau des atomreichen Moleküls ist mehrfach in Angriff genommen worden, sowohl durch Oxydation als durch Erhitzen mit Zinkstaub und durch Destillation mit Alkalien und alkalischen Erden. Indessen haben die dabei erlangten Resultate bis jetzt keinen sicheren Aufschluß gegeben, weder über die Art der Kohlenstoffverkettung, noch über die Rolle der Sauerstoff- und Stickstoffpaare des Moleküls. Nur die nächsten Umwandlungsprodukte des Strychnins sprechen dafür, daß das eine Stickstoffatom einem hydrierten Chinolin- oder Indolring angehört und seinen basischen Charakter durch Verbindung mit einer CO-Gruppe eingebüßt hat.

In neuerer Zeit ist das Strychnin eingehend von *J. Tafel* untersucht worden. Er studierte insbesondere die Einwirkung von Jodmethyl auf Strychnin und seine Derivate, die Reduktion des Strychnins und seiner Derivate und das Verhalten des Strychnins gegen Salpetersäure.[1])

Nach den Ergebnissen dieser Studien wird man im Molekül des Strychnins einen Anilinrest, wahrscheinlich in Form einer Tetrahydrochinolingruppe, anzunehmen haben, an deren Stickstoffatom ein im übrigen noch ringförmig verkettetes Carbonyl gebunden ist, so daß also das Strychnin als ein kompliziertes Säureanilid erscheint.

Die Studien von *H. Leuchs*[2]) nebst seinen Schülern scheinen bemerkenswerte Aufschlüsse über die Konstitution von Strychnin und Brucin zu bringen.

---

[1]) *J. Tafel*, Über Strychnin. Ann. d. Chem. Bd. **264**. S. 33; Über Strychnin. Bd. **268** (1892) S. 229; Über Strychnin. Bd. **301**. S. 285 (1898).

[2]) *H. Leuchs* und Mitarbeiter, Oxydation des Brucins und Strychnins nach einer neuen Methode. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 1711; Über ein neues Verfahren zur Darstellung von Sulfosäuren. S. 4393 (1908); Reaktionen der Brucinonsäure und eine Spaltung des Brucinmoleküls. Bd. **42**. S. 770 (1909).

In den Brechnüssen findet sich Strychnin an Igasursäure gebunden in Öltröpfchen gelöst vor, welche in dem Inhalt der Endospermzellen suspendiert sind und es zum Teil an Äther abgeben.[1]) Seine Menge beträgt in den Brechnüssen von Madras 0·28—0·625%, in denen von Ceylon 1·52 bis 1·80% (bei einem Gesamtalkaloidgehalt der letzteren von 4·24—5·34%, in dem Samen von *Strychnos Tienté* 1·47%, in den St. Ignatiusbohnen nach *Pelletier* 1·5%, nach *Pettenkofer* 1·4% (bei einem Gesamtalkaloidgehalt von 2—3%). *Sandor*[2]) fand in den Brechnüssen 2·73—3·13%, in den St. Ignatiusbohnen 3·11—3·22% Alkaloide, davon in den Alkaloiden der ersteren 43·9—45·9%, in den letzteren 60·7—62·8% Strychnin.

Zur *Darstellung des Strychnins im großen* dienen nur die Brechnüsse. *Coriol*[3]) kocht diese bis zum Erweichen mit Wasser, läßt sie dann mahlen, bringt die zerquetschten Massen zurück in das Wasser, preßt und macht noch eine zweite Abkochung davon. Es werden dann die Lösungen zum Sirup verdunstet und mit Weingeist vermischt, wobei die Alkaloide sowie etwas Fett in den letzteren übergehen. Die weingeistige Lösung wird abermals verdunstet, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Kalkmilch gefällt. Der abgepreßte und getrocknete Niederschlag wird dann mit 85%igem Weingeist behandelt, welcher das Brucin und den Farbstoff löst und das Strychnin zurückläßt.

Merck[4]) kocht die Brechnüsse, um deren Zerkleinerung zu erleichtern, anhaltend mit schwefelsäurehaltigem Wasser, mahlt sie dann und preßt sie im feuchten Zustande, kocht die Masse nochmals mit Wasser, preßt abermals und fällt die vereinigten Flüssigkeiten mit Kalk. Der Niederschlag wird hierauf nach dem Verfahren von *Corriol* behandelt.

Nach *Polenske*[5]) wird gegenwärtig das Strychnin in einer nordamerikanischen Fabrik in der Art gewonnen, daß die Brechnüsse in ganzer Form mit 3%iger Schwefelsäure anhaltend gekocht werden. Nach 3 Tagen sind dieselben vollkommen erweicht und geben einen klaren, tiefbraunen Auszug, der mit heißer Kalkmilch und etwas Ätznatron gefällt wird. Die Nüsse werden nochmals so behandelt, während ein dritter Auszug nicht mehr lohnt. Der Niederschlag enthält etwa 90% der Gesamtalkaloidausbeute; den Rest entzieht man der vom Niederschlag befreiten Flüssigkeit durch Petroleum. Aus dem Niederschlag selbst gewinnt man die Alkaloide durch drei- oder viermalige Extraktion mit Fuselöl, dem sie durch verdünnte Schwefelsäure entzogen werden, aus welcher Lösung dann durch weiteren Zusatz von Schwefelsäure das Strychninbisulfat gefällt wird, das durch Umkristallisieren vom Brucin vollkommen befreit und durch Kohle gereinigt, durch Ammoniak nun zersetzt wird.

---

[1]) *Gerock* und *Skippari*, Sitz der Alkaloide in Strychnossamen. Arch. d. Pharm. Bd. **230**. S. 55 (1893).

[2]) *Sandor*, Beiträge zur Kenntnis der Strychnosdrogen. Chem. Zentralbl. Jg. **1897**. I. S. 475.

[3]) *Corriol*, Darstellung von Strychnin. Journ. f. Pharm. Bd. **11**. S. 492.

[4]) *Merck*, Darstellung von Strychnin. *Trommsdorffs* Journ. d. Pharm. Bd. **20**. S. 1.

[5]) *Polenske*, Darstellung von Strychnin. Pharm. Zeitg. Bd. **41**. S. 177.

Zur Trennung des Strychnins vom Brucin empfiehlt *Horsley*[1]) das verschiedene Verhalten derselben in essigsaurer Lösung in Kaliumdichromat. In der betreffenden Industrie dient jedoch außer dem Bisulfat zur Abscheidung des Brucins noch die leichte Löslichkeit des letzteren in Alkohol oder des Nitrats desselben in Wasser. Das aus beiden Salzen durch Ammoniak abgeschiedene Alkaloid wird alsdann durch Umkristallisieren aus heißem Alkohol in die im Handel gangbare Form gebracht.

Das Strychnin kristallisiert beim freiwilligen Verdunsten seiner alkoholischen Lösung in körnigen Kristallen. Unter Umständen bildet es auch lange, seidenglänzende Nadeln. Schmilzt nach den Angaben von *Beckurts* bei 265°.

Das Strychnin ist licht- und luftbeständig; linksdrehend, und zwar beträgt $[\alpha]_r$ in weingeistiger Lösung 132·07° bis —136·78°; weit schwächer ist $[\alpha]_r$ jedoch in den sauren Lösungen.

Brucin.

Das Brucin findet sich, wie vorstehend erwähnt, häufig gemeinsam mit dem Strychnin im Holz und in den Samen verschiedener Strychnosarten und hat die Formel $C_{23}H_{26}N_2O_4$.

Die physiologische Wirkung des Brucins entspricht — jedoch in gemilderter Form — derjenigen des Strychnins. Es ist daher auch weniger giftig als dieses. Das Brucin ist ebenfalls wie das Strychnin eine einsäurige, tertiäre Base. Das gemeinschaftliche Vorkommen von Strychnin und Brucin und ihre gemeinschaftliche Eigentümlichkeit, trotz des Gehaltes an zwei Stickstoffatomen nur mit e i n e m Äquivalent Säure beständige Salze zu bilden, führten sehr frühzeitig zu der Vermutung, daß die beiden Alkaloide nahe verwandte chemische Individuen seien.

Tatsächlich lassen die gesamten Reaktionen des Brucins die Annahme wohl zu, daß dasselbe Dimethoxylstrychnin sei, beweisen dieselbe aber keineswegs. Der bündigste Beweis für diese Auffassung wäre das Gelingen der Überführung von Strychnin in Brucin oder umgekehrt.

Um Brucin darzustellen, werden nach *Shenstone*[2]) die zerkleinerten Samen von *Nux vomica* mit Alkohol erschöpft, der alkoholische Auszug wird mit $^1/_6$ Wasser versetzt und der Alkohol abdestilliert. Zum Rückstand fügt man Wasser und verdünnte Schwefelsäure und fällt die filtrierte saure Lösung mit Soda. Der Niederschlag wird in Chloroform gelöst, die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure geschüttelt und die saure Flüssigkeit mit Ammoniakdämpfen in der Kälte behandelt; im Filtrat von dem genannten Niederschlag sind noch Alkaloide vorhanden, die durch Schütteln mit Chloroform ausgezogen werden. Das gefällte Alkaloid wird mit wässerigem Alkohol behandelt und das aus dem Alkohol umkristallisierte Brucin mit

---

[1]) *Horsley*, Trennung von Strychnin und Brucin. Journ. f. prakt. Chem. Bd. **72**. S. 314.

[2]) *Shenstone*, Die Alkaloide von Nux vomica. Journ. Chem. Soc. Vol. **39**. p. 453 (1881); *Beilstein*, Handb. 3. Aufl. III. S. 944.

soviel verdünnter Schwefelsäure behandelt, daß die Lösung noch deutlich alkalisch bleibt. Nun wird durch Kaliumjodid das Brucin gefällt, der Niederschlag wiederholt aus Alkohol umkristallisiert und dann mit Soda und Chloroform behandelt. Aus dem Chloroform führt man das Brucin in verdünnte Säure über und fällt es dann mit Ammoniak.

Zur Trennung des Strychnins vom Brucin kann man die essigsaure Lösung der beiden Basen mit Kaliumchromat versetzen, wodurch zuerst nur Strychninchromat ausfällt. Oder man verdampft die essigsaure Lösung der beiden Basen im Wasserbad, wobei Strychninacetat alle Essigsäure verliert. Durch Übergießen mit Wasser wird aus dem Rückstand nur Brucinacetat ausgezogen.[1])

Brucin kristallisiert in wasserhellen, monoklinen Prismen oder in glänzenden Blättchen und enthält, aus Wasser kristallisiert, entweder 4 oder 2 Moleküle Kristallwasser, aus Alkohol kommt es mit der letztgenannten Wassermenge heraus (*Tafel* und *Moufang*[2]). Es schmilzt wenig über 100° in seinem Kristallwasser, während die wasserfreie Verbindung den Fp. 178° zeigt. Die Base ist linksdrehend; ihre Chloroformlösung zeigt, je nach der Konzentration, die Drehung $[\alpha]_D = -119-127°$ *(Oudemans)*.[3]) Sie ist in Wasser und Alkohol leichter löslich als Strychnin und bleibt deshalb in den Mutterlaugen der Strychnindarstellung.

Die Trennung des Brucins vom Strychnin.[4]) Wenn Salpetersäure unter geeigneten Bedingungen auf ein Gemisch von Strychnin und Brucin einwirkt, wird das Brucin in nicht basische, stark gefärbte Substanzen zersetzt, während Strychnin unverändert bleibt. Auf diese Weise können beide Alkaloide voneinander getrennt werden. Reine salpetrige Säure scheint ohne Einwirkung auf Brucin zu sein, bei Gegenwart von Salpetersäure beschleunigt sie dagegen dessen Oxydation. Für die Bestimmung des Strychnins ergibt sich folgendes: Auf eine Gesamtmenge von 0·4 *g* Alkaloid soll die einwirkende Lösung wenigstens 7% Salpetersäure enthalten. Die Reaktion muß nach 10 Minuten unterbrochen werden. Die Temperatur soll 25° nicht übersteigen. Zum Ausfällen des Strychnins wird zweckmäßig Natronlauge oder Kalilauge benutzt. Die Salpetersäure soll als Säure von der Dichte 1·42 zugesetzt werden. Bei Anwendung verdünnterer Säure fügt man eine Spur Nitrit bei.

[1]) *Flückiger*, Trennung von Strychnin und Brucin. Jahresber. Jg. **1875**. S. 983; vgl. auch *Dunstan* und *Short*, Ein neues Glycosid aus Strychnos Nux vomica. Ebenda. Jg. **1883**. S. 1615.

[2]) *Tafel* und *Moufang*, Über Brucin. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **304**. S. 37 (1899).

[3]) *Oudemans*, Über den Einfluß inaktiver Lösungsmittel auf das spezifische Drehungsvermögen aktiver Substanzen. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **166**. S. 69 (1873).

[4]) *Reynolds* and *Sutcliffe*, Die Trennung des Brucins vom Strychnin. Einfluß der salpetrigen Säure bei der Oxydation durch Salpetersäure. Journ. Soc. Chem. Ind. Vol. **25**. p. 512 (1906); *Farr* und *Wright*, Das Salpetersäureverfahren für die Bestimmung des Strychnins. Pharm. Journ. [4.] Bd. **23**. S. 83 (1906).

Curare-Alkaloide.

Aus Curare, dem Pfeilgift der Eingeborenen Südamerikas, lassen sich nach Untersuchungen von *Böhm* verschiedene giftige Alkaloide isolieren.[1]) *Böhm* untersuchte drei Sorten Curare, die nach ihrer Original-Verpackungsart bezeichnet werden als: *Tubocurare* (in Bambusröhren verpackt), *Calebassencurare* (in Flaschenkürbissen verpackt), *Topfcurare* (in ungebrannten Tontöpfchen verpackt).

Zur *Darstellung von Calebassencurarin* z. B. verfährt man folgendermaßen: Durch Ausfällen der wässerigen Lösung mit Platinchlorid gewinnt man zunächst das Platinsalz der Base. Es wird in Alkohol suspendiert, in der Hitze mit Schwefelwasserstoff unter Zusatz von etwas alkoholischem Ammoniak zersetzt, aus der alkoholischen Lösung wird die Base durch Zusatz des fünffachen Volumens Äther gefällt. Zur Reinigung wird es in einem Gemische von 4 Teilen Chloroform und 1 Teil absolutem Alkohol gelöst; die filtrierte Lösung wird an der Luft verdunstet. Man löst den zurückbleibenden roten Lack in absolutem Alkohol und fällt die Lösung mit Äther. Durch öfteres Wiederholen dieser Operation reinigt man das Curarin so lange, bis 0·34 *mg* für 1 *kg* tödliche Dosis sind. Die so dargestellte Substanz ist leicht löslich in Wasser, Alkohol, Methylalkohol, unlöslich in Äther, Chloroform, Benzol, Petroläther, Aceton. Sie wird niemals kristallinisch erhalten, schmeckt intensiv bitter, zersetzt sich oberhalb 150°. In ihr liegt nicht die Base selbst, sondern das Chlorid vor, welches wechselnde Mengen Salzsäure sehr fest gebunden enthält. Aus dem Curarinplatindoppelsalz ergibt sich die Formel des Curarins $C_{19} H_{26} N_2 O$.

IV. Alkaloide der Isochinolingruppe.

In diese Gruppe sind drei Opiumalkaloide, nämlich Papaverin, Narkotin und Narcein einzureihen. Die beiden ersten sind direkt Abkömmlinge des Isochinolins, während das letztere zu demselben in gewisser Beziehung steht. Außerdem gehören hierher die in der Wurzel von Hydrastis canadensis auftretenden Alkaloide Hydrastin und Berberin.

Papaverin.[2])

Tetramethoxybenzylisochinolin:

```
 O.CH3

   C                      CH   CH
HC/ \C.O.CH3          HC/ \ C / \C.O.CH3
HC\ /CH                N\  / C \ /C.O.CH3
   C ———————— CH2          C    CH
```

[1]) *R. Böhm,* Annal. d. Pharm. Bd. **235**. S. 660 (1905); Das südamerikanische Pfeilgift Curare in chemischer und pharmakologischer Beziehung. Abh. kgl. Sächs. Ges. Wissensch. Bd. **24**. S. 1 (1897).

Das Papaverin wurde im Jahre 1848 von *Merck* aus dem Opium, in dem es in geringer Menge (0·8—1%) enthalten ist, abgeschieden. Es kristallisiert in Prismen und schmilzt bei 147°, ist in Wasser und in Alkalien fast unlöslich. Die vorstehend angeführte Konstitution desselben folgte aus den schönen und umfassenden Arbeiten von *Guido Goldschmiedt.*[1])

Das Papaverin findet sich neben Narkotin und anderen Basen in der Mutterlauge des aus dem Opiumauszuge ausgeschiedenen Morphins und kann von Narkotin durch Oxalsäure getrennt werden. Das Papaverin gibt ein schwer lösliches Dioxalat, während Narkotin in Lösung bleibt.

Hesse[2]) trennt die aus der Mutterlauge vom salzsauren Morphin erhaltenen Alkaloide zunächst in benzin- oder ätherlösliche und darin unlösliche, dann die ersteren in Alkali lösliche und unlösliche und letztere in solche, die Essigsäure neutralisieren und solche, welche das nicht tun. Zu den Opiumalkaloiden der letzteren Art gehört nun unter den obwaltenden Verhältnissen das Narkotin, Papaveramin, Papaverin und Pseudopapaverin. Das Gemisch (100 Teile) wird an Oxalsäure (37 Teile $H_2C_2O_4 + 2H_2O$) in heißer wässeriger Lösung gebunden, worauf sich beim Erkalten die sauren Oxalate der letzteren drei Alkaloide nahezu vollkommen abscheiden. Durch wiederholtes Umkristallisieren derselben aus Wasser erhält man schließlich das Papaverinoxalat.

Es wird mittelst Chlorcalcium in das salzsaure Salz übergeführt, die Base aus der Lösung desselben mit Ammoniak gefällt und aus Alkohol umkristallisiert.

Zur Trennung von Papaverin und Narkotin kann man auch die Tatsache benutzen, daß aus einem Gemenge der beiden Alkaloide Ferricyankalium nur Papaverin fällt.[3])

Die Synthese von Substanzen, welche in ihrer Konstitution dem Papaverin nahestehen, ist in der Neuzeit von verschiedenen Forschern durchgeführt worden.[4])

[1]) *G. Goldschmiedt,* Untersuchungen über Papaverin. Wiener Monatsh. f. Chem. Bd. **4**. S. 704; B. **6**. S. 372, 667, 954; Bd. **7**. S. 485; Bd. **8**. S. 510; Bd. **9**. S. 42, 327, 349, 679, 762, 778; Bd. **10**. S. 673, 692 (1883—1889).

[2]) *Hesse,* Beiträge zur Kenntnis der Opiumbasen. Annal. d. Chem. Bd. **153**. S. 75 (1870).

[3]) *Plugge,* Über eine neue Trennungsmethode der Opiumalkaloide. Rec. trav. chim. T. **6**. p. 157 (1887).

[4]) Man vgl. *Decker, Pschorr* und Mitarbeiter, Über einige Ammoniumverbindungen: Synthese einer Oxydihydrobase. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **37**. S. 575; Bildung sauerstofffreier tertiärer Basen aus den Cyclammoniumhydroxyden. S. 1564; Über die Einwirkung von Benzylmagnesiumchlorid auf Cyclaminone. S. 3396 (1904). — *A. Pictet,* Synthese des Laudanosins. Chem.-Zeitung, Bd. **33**. S. 329 (1909).

Laudanosin.

d-N-Methyltetrahydropapaverin:

```
    OCH3

     C                     CH3   CH
HC/   \C.OCH3        H2C/  \C/  \C.OCH3
 |     |              |     |    |
HC\   /CH        CH2.N\   /C\   /C.OCH3
    C---------CH2-----------CH    CH
```

Unter den Alkaloiden des Opiums finden sich verschiedene, die in der Droge in ganz untergeordneter Menge enthalten und deshalb auch wenig untersucht worden sind. Zu diesen meist von *O. Hesse* isolierten Basen gehört das Laudanosin.

Es findet sich neben Papaverin, Narkotin etc. in der Mutterlauge des aus dem Opiumauszuge ausgeschiedenen Morphins. Nach der Narkotin-Papaverinkristallisation ist es in der essigsauren Lösung neben Thebain und Cryptopin vorhanden und kann von diesen getrennt werden durch seine Leichtlöslichkeit in Äther und die Fähigkeit, durch Jodkalium aus seinen Lösungen gefällt zu werden.

A. Pictet und *B. Athanasescu* erhielten das Laudanosin, indem sie das Chlormethylat des Papaverins mit Zinn und Salzsäure reduzierten und das Produkt (razemisches Methyltetrahydropapaverin) mittelst Chinasäure in seine beiden optischen Modifikationen spalteten: die rechtsdrehende Modifikation erwies sich als identisch mit dem Opiumlaudanosin. Diese partielle Synthese stellte die Konstitution des Laudanosins fest.

Es ist dann *Pictet*[1]) in Gemeinschaft mit Frl. *M. Finkenstein* gelungen, die Totalsynthese des Laudanosins zu bewerkstelligen. Die lange Reihe der Operationen, die zu diesem Resultat führte, kann wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Darstellung des Homoveratrylamins:

$$(CH_3O)_2C_6H_3 . CH_2 . CH_2 . NH_2,$$

durch Einwirkung von unterbromigsaurem Natrium auf Dimethylhydrokaffeesäureamid: $(CH_3O)_2C_6H_3 . CH_2 . CH_2 . CONH_2$, welches selbst aus Methylvanillin durch bekannte Reaktionen gewonnen wurde.

2. Darstellung der Homoveratrumsäure aus Eugenol nach Vorschrift von *Tiemann* und Überführung derselben in ihr Chlorid:

$$(CH_3O)_2C_6H_3 . CH_2 . COCl.$$

3. Zusammenbringen des Homoveratrylamins und des Homoveratrumsäurechlorids in Gegenwart von Natronlauge, wobei Homoveratryl-homoveratrumsäure entsteht:

$$(CH_3O)_2C_6H_3 . CH_2 . CH_2 . NH . CO . CH_2 . C_6H_3(OCH_3)_2.$$

---

[1]) *A. Pictet* und *Marie Finkenstein*, Synthese des Laudanosins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 42. S. 1979 (1909).

4. Behandlung dieser letzten Verbindung mit Phosphorpentoxyd, wobei Wasserentziehung unter Ringschließung stattfindet und **Dihydropapaverin** nach folgender Gleichung gebildet wird:

CH_2
CH_3O CH_2
CH_3O NH
CO
CH_2
OCH_3
OCH_3

=

CH_2
CH_3O CH_2
CH_3O N
C
CH_2
OCH_3
OCH_3

$+ \quad H_2O.$

5. Überführung des Dihydropapaverins in sein Chlormethylat und Reduktion desselben mit Zinn und Salzsäure. Das Produkt dieser Operation erwies sich als identisch mit dem Methyltetrahydropapaverin aus Papaverin. Da das Methyltetrapapaverin in seine rechtsdrehende Modifikation umgewandelt werden kann und diese sich mit dem natürlichen Laudanosin als identisch erwiesen hat, so ist die vollständige Synthese dieser Base erreicht.

Laudanosin stellt das erste Opiumalkaloid, dessen künstliche Darstellung gelungen ist, dar.

Es kristallisiert in Nadeln, welche bei 89° schmelzen und in Alkali unlöslich sind.

Narkotin und Hydrastin:

$O.CH_3$
$O.CH_3$
$C:O$
$HC—O$
$H_3C.O$
HC
O — $N.CH_3$
H_2C
O — CH_2
CH_2

Narkotin-Mekoninhydrokozarnin-Methoxyhydrastin

$O.CH_3$
$O.CH_3$
$C:O$
$HC—O$
HC
O — $N.CH_3$
H_2C
O — CH_2
CH_2

Hydrastin.

Das **Narkotin** wurde im Jahre 1817 von *Robiquet* isoliert. Es findet sich im Opium im freien Zustande und kann daraus durch Auskochen mit Äther gewonnen werden.

Wird Opium mit Wasser extrahiert, wie das für die Gewinnung von Morphin geschieht, so bleibt das Narkotin hauptsächlich in dem Rückstande oder Opiummark, dem es mit verdünnter Salzsäure entzogen werden kann. Letztere Lösung wird dann mit Natriumbikarbonat gefällt und die Base dem Niederschlage mit heißem 80%igen Weingeist entzogen, welcher sie beim Erkalten in Kristallen abscheidet. Bei der Darstellung des Morphins nach dem Verfahren von *Robertson-Gregory* (siehe S. 953) bleibt das Morphin in der dunkel gefärbten Mutterlauge vom Morphinchlorhydrat gelöst und kann daraus mit Ammoniak gefällt werden. Der harzige Niederschlag wird in heißer alkoholischer Lösung mit Essigsäure bis zur neutralen Reaktion behandelt, worauf beim Erkalten ein Gemisch von Narkotin und Papaverin kristallisiert. Letzteres ist, wie aus den Darlegungen S. 943 hervorgeht, leicht mittelst Oxalsäure zu trennen. Von Morphin kann das Narkotin auch leicht durch Kalilauge geschieden werden, da die erstgenannte Base in kalter Kalilauge löslich, die letztere aber darin unlöslich ist.

Das Narkotin bildet farblose glänzende Kristalle, und zwar teils platte Nadeln, teils derbe rhombische Prismen, ist geruch- und geschmacklos. Es schmilzt bei 176° und erstarrt beim Erkalten strahlig kristallinisch.

Das **Hydrastin** kommt in der Wurzel von Hydrastis canadensis L., einer zu den Ranunculaceen gehörigen, in Nordamerika einheimischen Pflanze, vor. In dem Hydrastisrhizom findet sich das Hydrastin teils frei, teils an Säuren gebunden. Außer ihm kommt darin auch Berberin und in geringer Menge ein drittes Alkaloid, das Canadin, vor. Der Gehalt der Wurzel an Hydrastin beträgt etwa 1·5%.[1])

Die Aufklärung der Konstitution des Hydrastins erfolgte in den letzten 20 Jahren durch die Arbeiten von *E. Schmidt*[2]) und insbesondere durch die von *Martin Freund*[3]) und seinen Schülern.

Zur Darstellung der Base extrahiert man die fein gepulverte Wurzel von Hydrastis canadensis L. mit Äther, wobei nur das Hydrastin aufgenommen wird. Man dunstet die ätherische Lösung ein, löst den Rückstand in heißem Alkohol und filtriert die heiße Lösung. Das Filtrat scheidet beim Erkalten Kristalle von Hydrastin in fast reinem Zustande ab.

Das Hydrastin schmilzt bei 132°, ist in Wasser fast unlöslich, in Chloroform und Benzol leicht, in Äther und Alkohol schwerer löslich. Die Lösungen sind optisch aktiv. Bei gelinder Oxydation zerfällt das Hydrastin fast quantitativ in Opiansäure und Hydrastinin:

$$\underset{\text{Hydrastin}}{C_{21}H_{21}NO_6} + H_2O + O = \underset{\text{Opiansäure}}{C_{10}H_{10}O_5} + \underset{\text{Hydrastinin.}}{C_{11}H_{13}NO_3}$$

[1]) *Wilhelm,* Über Berberisalkaloide. Arch. d. Pharm. [3.] Bd. **24**. S. 323 (1888).

[2]) *E. Schmidt,* Über Berberisalkaloide. Arch. d. Pharm. Bd. **224**. S. 974; Bd. **226**. S. 329; Bd. **228**. S. 49, 241 u. 596; Über das Hydrastin. Bd. **231**. S. 541 (1893).

[3]) *Martin Freund* und Mitarbeiter, Beiträge zur Kenntnis des Hydrastins. Ann. d. Chem. Bd. **271**. S. 311 (1893).

Der Extrakt der Wurzel Hydrastis canadensis, aus dem das Hydrastin gewonnen wird, hat in Amerika schon lange therapeutische Verwendung gefunden.[1] Im Jahre 1883 ist er von *Schatz* als Mittel zur Bekämpfung uteriner Blutungen empfohlen worden und hat sich dann schnell Eingang in den Arzneischatz verschafft. Da die Droge hauptsächlich Berberin (4%) und Hydrastin (ca. 1%) enthält und andere Berberin enthaltende Pflanzen eine Anwendung als Styptica nicht erfahren haben, lag die Vermutung nahe, daß die Wirksamkeit der Hydrastiswurzel ihrem Gehalt an Hydrastin zuzuschreiben sei. Die pharmakologische Untersuchung des Hydrastins hat ergeben, daß dasselbe klinisch nicht zu verwenden ist.

Nun ist aber die Wirkung der Hydrastis eine kumulative; das Mittel wirkt kaum oder doch nur recht unsicher bei bereits eingetretener Blutung, während es gute Resultate erzielt, wenn es längere Zeit hindurch vor Eintritt der Blutung gegeben wird. Dieses Verhalten rief die Vermutung hervor, daß das Mittel erst dann seine Wirkung entfalten kann, wenn unter dem langsam oxydierenden Einfluß des Organismus eine Spaltung des Hydrastins in Opian- respektive Hemipinsäure und Hydrastinin eingetreten ist, daß also die letztgenannte Base die eigentlich wirksame Substanz der Hydrastis sei.

Das Hydrastinin, welches nach der Formel:

```
                    CH   C<H
                             O
                   /\ C /
      O — C //      \/    NH . CH3
CH2<         |      ||   |
      O — C \\      /\   /CH2
              \ / C  \  /
              CH    CH2
```

als ein Piperonal aufzufassen ist, das in der Orthostellung zur Aldehydgruppe eine stickstoffhaltige Seitenkette trägt, wurde von *Fritsch* synthetisch dargestellt.[2]

Narcein:

```
                 CO ——————————————<  >=< . O CH3
                 |                 \\ //
   CH3 O        CH2            HO OC    O CH3
      .    /\  /     N<CH3
     O . //  \/        CH3
CH2<    |    ||    |
     O . \\  /\   /CH2
           \/  \ /
               CH2
```

[1]) *E. Falk*, Hydrastin und Hydrastinin. *Virchows* Archiv. Bd. **190**. S. 399. — Derselbe, Über Hydrastinin und dessen Anwendung bei Uterusblutungen. Therapeut. Monatsh. Jg. **1890**. S. 19. Arch. f. Gynäk. Bd. **37**. S. 295. — *Abel*, Hydrastinin bei Gebärmutterblutungen. Berl. klin. Wochenschr. Jg. **1892**.

[2]) *Fritsch*, Über substituierte Isochinoline und deren Tetrahydroderivate. Synthese des Hydrastinins. Ann. d. Chem. Bd. **286**. S. 18 (1895).

M. Freund[1]) hat für das Narcein auf Grund eingehender Untersuchungen die vorstehende Formel abgeleitet, nach der es als substituiertes Phenylbenzylketon erscheint. Damit stehen auch alle seine Reaktionen in bestem Einklang.

Das Narcein bildet weiße Kristalle vom Fp. 171° und findet sich nur in kleiner Menge (0·1%) im Opium.

Das bei 100° vollkommen entwässerte Narcein schmilzt schon bei 140—145°.

Bei der Gewinnung des Morphins nach dem später zu behandelnden Verfahren von *Robertson-Gregory* findet sich das Narcein neben anderen Alkaloiden in der dunkelgefärbten Mutterlauge vom Morphin- und Kodeinhydrochlorid. Man übersättigt dieselbe mit Ammoniak und fällt mit Bleizucker. Nach Entfernung des überschüssig zugesetzten Bleies aus dem Filtrate wird die vom Bleisulfat abfiltrierte Lösung konzentriert, wobei schließlich ein Gemenge von Narcein und Mekonin kristallisiert. Dieses Gemenge kann mittelst Äther in seine Bestandteile getrennt werden, da derselbe nur das Mekonin aufnimmt, während das Narcein ungelöst zurückbleibt. Letzteres läßt sich durch Umkristallisieren aus kochendem Wasser reinigen.

Berberin:

```
                                O—CH2

                                  C
                              HC/   \CO
 H3CO.C      CH      C|            |CH
 H3CO.C  /\  C/  \  C/ \\  /
                              C
  HC      C      N        CH2
      CH     CH  |   CH2
                OH3
```

Das Berberin kann außer nach der vorstehenden Formel mit der Gruppe —CH=N(OH)—CH_2— auch als Aldehyd mit den Gruppen —CH:O und —NH—CH_2— reagieren, wenn auch die Aldehydabkömmlinge von geringer Beständigkeit sind. Das Berberiniumhydroxyd von obiger Formel ist nur in Lösung bekannt, dagegen in fester Form nicht existenzfähig, da es beim Eindunsten der Lösungen unter gleichzeitiger tiefgehender Zersetzung in die Pseudoform mit der Aldehydgruppe übergeht; doch leiten sich von ihm verschiedene Berberinderivate ab.[2])

[1]) *M. Freund* und Mitarbeiter, Untersuchungen über das Narcein. Ann. d. Chem. Bd. 277. S. 20 (1893); Untersuchungen über das Narcein. Bd. 286. S. 248 (1895); Untersuchungen über das Narcein. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 40. S. 194 (1907).

[2]) *J. Gadamer,* Über das Berberin. Arch. d. Pharm. Bd. 243. S. 31 (1905).

Das Berberin ist eines der wenigen Alkaloide, die sich in ganz verschiedenen Pflanzenfamilien vorfinden. Es ist im Jahre 1826 aus der Rinde von Xanthoxylum clava Herculis von *Chevallier* und *Pelletan* dargestellt worden, welche ihm den Namen „Xanthopicrit" gaben. *Buchner* bemerkte es 1837 in der Wurzel der Berberitze. *Perrins* gewann es aus der Wurzel von Hydrastis canadensis, wo es das Hydrastin begleitet. Andere Beobachter begegneten ihm auch in einer großen Zahl von Pflanzen aus den Gattungen Coptis, Cocculus, Coccinium, Coclocine, Geoffroya etc.

Zur Darstellung von Berberin aus der Wurzelrinde von Berberis vulgaris [1]) wird der durch Digestion mit warmem Wasser erhaltene Auszug verdampft, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen und die alkoholische Lösung zur Kristallisation eingeengt. Die kristallinische Masse wird zuerst durch Auswaschen mit kaltem Wasser und Abpressen von einem Teil der Mutterlauge befreit. Hierauf stellt man durch Auflösen in Säure ein Salz dar, das durch Umkristallisieren gereinigt wird und aus dem man schließlich das Berberin mittelst einer Base abscheidet.

Die vielfach als Arzneimittel gebrauchte Columbowurzel wird zur Gewinnung von Berberin mit Alkohol extrahiert und das alkoholische Extrakt nach dem Abdampfen und Trocknen in der Wärme mit Kalkwasser behandelt. Beim vorsichtigen Neutralisieren mit Salzsäure entsteht in der braunroten Lösung ein gefärbter amorpher Niederschlag. Nach dem Übersättigen mit Salzsäure scheidet sich aus dem Filtrat beim mehrtägigen Stehen eine Kristallisation von Berberinchlorhydrat ab.

Nach *Merril* [2]) wird das wässerige Extrakt der Wurzel von Hydrastis canadensis mit Alkohol ausgezogen. Man versetzt die Tinktur mit etwas Wasser, destilliert den größten Teil des Alkohols ab und säuert die Flüssigkeit mit Schwefelsäure an. Das beim Stehen kristallisierende Berberinsalz wird in Wasser gelöst und mit etwas überschüssigem, frisch gefälltem Bleioxyd digeriert. Aus dem Filtrat kristallisiert Berberin aus.

Zur Reindarstellung des Berberins aus dem Rohprodukt wird zweckmäßig die schwer lösliche Acetonverbindung, $C_{20}H_{17}NO_4 . C_3H_6O$, benutzt. Sie fällt als zitronengelbes Kristallpulver aus, wenn man eine heiße Lösung von 50 *g* kristallisiertem Berberinsulfat in 1 *l* Wasser mit 500 *g* Aceton und Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Um daraus das Berberin wieder abzuscheiden, kocht man 2 *g* der Verbindung mit 50 cm^3 absolutem Alkohol und 5 cm^3 Chloroform während 12 Stunden. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wird der Rückstand aus Wasser umkristallisiert.

Das so gereinigte Berberin bildet gelbbraune Nadeln oder feine Prismen, die 6 Mol. Kristallwasser enthalten. Es schmilzt bei 145°, zersetzt sich oberhalb 150° und ist inaktiv. In heißem Wasser und Alkohol ist es leicht, in Äther, Essigäther, Benzol, Chloroform und Ligroin schwer löslich.

---

[1]) *J. A.* und *L. A. Buchner*, Über das Berberin. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **24**. S. 228.

[2]) *Merril*, Jahresber. Jg. **1864**. S. 452.

Synthesen von Abkömmlingen des Dihydroberberins wurden in der Neuzeit von *M. Freund* und seinen Mitarbeitern mit Hilfe der Organomagnesiumhaloide durchgeführt.[1])

Corydalisalkaloide.

Die Wurzel von Corydalis cava (Familie der Fumiariceen) enthält mehrere Alkaloide, von denen bisher acht isoliert worden sind[2]), nämlich: Corydalin, Corybulbin, Corycavin, Bulbocapnin, Corytuberin, Isocorybulbin, Corycavanin und Corydin. Sie lassen sich nach ihrem chemischen Verhalten in die Corydalin-, Corycavin- und Bulbocapningruppe einteilen und am besten untersucht ist von ihnen das **Corydalin** von der Formel:

```
                                        C.OCH3
                                     HC/    \C.OCH3
                                       |     ||
      CH3O.C      H2C                  C      CH
  CH3O.C/   \C/     \CH/            /    \\  /
     |      ||       |                    C
  HC\\      C\      N\                    |CH2
     HC      HC       \        CH2
             |
            CH3
```

Es kristallisiert aus Alkohol in Prismen vom Fp. 134—135°, ist unlöslich in Wasser und Alkalien, ziemlich löslich in Alkohol, leicht löslich in Äther, Chloroform und Benzol.

Zur Isolierung der Corydalisalkaloide kann folgendes Verfahren dienen: Die zerkleinerten Wurzelknollen werden mit Alkohol extrahiert, der Alkohol abdestilliert, die zurückbleibende, schwach sauer reagierende wässerige Lösung abfiltriert, mit Ammoniak übersättigt und mit Äther ausgeschüttelt. Nachdem die ätherische Lösung stark eingeengt ist, scheidet sich eine Fraktion aus, die bei etwa 160° schmilzt und aus etwa 60% Bulbocapnin, 30% Corydalin und 10% Corycavin besteht. Nach weiterem Einengen der ätherischen Mutterlauge und Versetzen derselben mit Alkohol wird eine Fraktion erhalten, die zu fast gleichen Teilen aus Bulbocapnin und Corydalin besteht und etwa bei 126—130° schmilzt. Die letzte Mutterlauge liefert schließlich eine amorphe, bei 50—60° schmelzende Masse, die die übrigen Alkaloide enthält.

Die Alkaloide der beiden ersten Fraktionen können nach *Freund* und *Josephi* folgendermaßen voneinander getrennt werden.[3]) Man trägt die salz-

---

[1]) *M. Freund* und Mitarbeiter, Versuche zur Herstellung von Alkaloiden der Isochinolinreihe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **37**. S. 3336; Über α-Methyltetrahydroberberin. Bd. **38**. S. 2652 (1905); Über eine Reihe neuer, vom Dihydroberberin sich herleitender Basen. S. 4673 (1904); Über Homologe des Berberins und Canadins. Bd. **40**. S. 2604 (1907).

[2]) *J. Gadamer*, Über Corydalisalkaloide. Arch. d. Pharm. Bd. **243**. S. 147 (1905).

[3]) *Freund* und *Josephi*, Untersuchungen über die in der Wurzel von Corydaliscava (Schwgg.) enthaltenen Alkaloide. Ann. d. Chem. Bd. **277**. S. 19 (1893).

saure Lösung des Gemisches in überschüssige 5%ige Natronlauge ein, wobei Corydalin und Corycavin ausfallen. Dahingegen bleibt das Bulbocapnin gelöst und kann aus der Lösung durch Einleiten von Kohlendioxyd oder durch Zusatz von Chlorammonium abgeschieden werden. Da Corydalin in Alkohol leichter löslich ist als Corycavin, so kann die Mischung beider durch fraktionierte Kristallisation aus absolutem Alkohol in die Komponenten zerlegt werden. Auch durch Behandeln des Gemisches mit verdünnter Salzsäure läßt sich die Trennung durchführen. Dabei wird zunächst das Corycavinsalz abgeschieden, während Corydalin gelöst bleibt und aus der Mutterlauge von ersterem zu fällen ist. Aus 10 *kg* Corydalisknollen entstehen gegen 90 *g* Corydalin.

Neuerdings hat *K. Makoshi* die Isolierung der Alkaloide aus chinesischen Corydalisknollen (Corydalis ambigna) eingehend beschrieben.[1])

Die *physiologische Untersuchung der acht Corydalisalkaloide* hat *Peters*[2]) durchgeführt. Die an Kalt- und Warmblütern ausgeführten Versuche haben gezeigt, daß die von *Gadamer* getroffene Einteilung der acht Alkaloide Corydalin, Corybulbin, Corycavin, Bulbocapnin, Corytuberin, Isocorybulbin, Corycavanin und Corydin nach ihrem chemischen Verhalten in die Corydalin-, Corycavin- und Bulbocapningruppe im allgemeinen richtig ist. Nur das Corytuberin nimmt in pharmakologischer Beziehung eine ähnliche Sonderstellung ein wie in chemischer. Während alle anderen Alkaloide morphiumartig wirken und das Herz angreifen, ist dies beim Corytuberin nicht der Fall. Im übrigen unterscheiden sich die drei chemischen Gruppen in ihrer physiologischen Wirkung derart, daß die Corydalingruppe eine Lähmung des Rückenmarks, die Corycavingruppe eine Erregung motorischer Zentren und die Bulbocapningruppe, wenigstens bei Fröschen, eine Steigerung der Reflexerregbarkeit hervorruft. In praktischer Richtung dürfte nur das Bulbocapnin in Betracht kommen, und zwar wegen seiner Eigenschaft, auf Katzen und vielleicht auch auf Pferde, Rinder u. a. m. beruhigend zu wirken.

V. Alkaloide der Phenanthrengruppe.

Es wird zurzeit allseitig die Annahme gemacht, daß die nunmehr zu besprechenden Alkaloide Morphin, Codein und Thebain einen Phenanthrenkern enthalten. Dahingegen herrschen noch Zweifel darüber, welcher Art der stickstoffhaltige Ring ist, der diesen Alkaloiden zugrunde liegt. Die von *Knorr* begründete und von vielen geteilte Ansicht, daß sich dieselben von der Morpholin genannten Base herleiten, hat in neuerer Zeit mit dem Anwachsen des experimentellen Materials immer mehr und mehr an Bedeutung verloren und ist schließlich von *Knorr* selbst vollständig aufgegeben

[1]) *K. Makoshi*, Über die Alkaloide der chinesischen Corydalisknolle. Arch. d. Pharm. Bd. **246**. S. 381; Über das Protopin der japanischen Corydalisknollen: Corydalis Verny. S. 401 (1908).

[2]) *Peters*, Pharmakologische Untersuchungen über Corydalisalkaloide. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **51**. S. 130 (1904).

worden. Die Untersuchungen von *Pschorr* machen es höchst wahrscheinlich, daß auch in diesen Verbindungen ein Pyridinring anzunehmen ist, doch sind andere Möglichkeiten noch nicht vollkommen ausgeschlossen. Es erscheint deshalb zweckmäßig, die Bezeichnungsweise nach dem basischen Komplex, der den Alkaloiden zugrunde liegt, zurzeit hier nicht anzuwenden und wir haben dafür die in der Überschrift angeführte gewählt.

Morphin.

Das Morphin ist die Hauptbase des Opiums (3—23%). Es ist das erste aus dem Pflanzenreich gewonnene Alkaloid. Seine Entdeckung durch den Apotheker *Sertürner* stammt aus dem Jahre 1806. Die von *Laurent* bestimmte Zusammensetzung entspricht der Formel $C_{17}H_{19}NO_3 + H_2O$. Es kristallisiert aus Alkohol in kleinen Prismen, welche bei 230° unter Zersetzung schmelzen, ist sehr wenig in Wasser löslich, geruchlos, von bitterem Geschmack, linksdrehend und von narkotischer Wirkung. Sein salzsaures Salz, $C_{17}H_{19}NO_3 . HCl + 3H_2O$, Morphium hydrochloricum, bildet seidenglänzende, feine Nadeln und findet bekanntlich vielfache Anwendung als schmerzstillendes, schlaferregendes Mittel.

Zur Frage nach der Konstitution des Morphins haben insbesondere die aus der Neuzeit stammenden Untersuchungen von *L. Knorr*, von *Vongerichten* und von *Pschorr* reichhaltiges experimentelles Material geliefert. Doch läßt sich das letzte Wort über die Konstitution desselben noch nicht sprechen.

Die *drei Sauerstoffatome des Morphins*, $C_{17}H_{19}NO_3 + H_2O$, besitzen verschiedene Funktionen. Eines gehört einem Phenolhydroxyl an, das dem Morphin den sauren Charakter verleiht. Der Wasserstoff dieses Hydroxyls ist durch Metalle, durch Säurereste und durch Alkyle substituierbar. Im Kodein, das wir weiter unten behandeln werden, ist dieses Wasserstoffatom durch ein Methyl ersetzt. Das Kodein stellt also einen Methylester des Morphins dar. Die Frage nach der Konstitution des Kodeins fällt somit mit der nach der Konstitution des Morphins zusammen. Das zweite Sauerstoffatom des Morphins gehört einer Alkoholgruppe an. Das dritte Sauerstoffatom verhält sich indifferent und ist nach *Vongerichten* wie in den Äthern zweifach mit Kohlenstoff verbunden — „Brückensauerstoffatom".

Der *Stickstoff des Morphins* steht in einem Ringe; er ist dreifach an Kohlenstoff gebunden, also tertiär.

Von den *17 Kohlenstoffatomen* des Morphins gehören 14 einem Phenanthrenkern an, da die stickstofffreien Spaltungsprodukte stets Derivate des Phenanthrens sind.

Unter Berücksichtigung des gesamten bisher vorliegenden experimentellen Materials hat *L. Knorr*[1]) vor kurzem folgende „Brückenringformel" des Morphins aufgestellt:

---

[1]) *L. Knorr*, Über die Haftstellen des stickstoffhaltigen Nebenringes im Kodein und über die Konstitution der Morphiumalkaloide. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **40**. S. 3341 (1907).

H_2 H
H $CH_3 . N$ H
H_2C
H CH_2 H_2
H
OH HOH
O

Das Morphin findet sich im Milchsafte der Papaver somniferum (L.), namentlich reichlich in dem der Samenkapseln etwa 10 Tage nach dem Abfallen der betreffenden Blumenblätter. Man hat es auch in einigen anderen Pflanzen aufgefunden, so im Argemone mexicana L. (Familie der Papaveraceen) und im wilden amerikanischen Hopfen[1]) (Humulus lupulus L., Familie der Cannabinaceen).

Zur Darstellung des Morphins im großen eignet sich nur das Opium. Letzteres wird aus dem Milchsafte, der aus den angeritzten Mohnkapseln ausfließt, in verschiedener Weise gewonnen[2]); es enthält dementsprechend wechselnde Mengen (von Spuren bis gegen 21%) Morphin, welches in demselben an Mekon- und Schwefelsäure gebunden ist. Zur Gewinnung dieses Alkaloids sind verschiedene Verfahren angegeben worden.

Nach dem von *Gregory*[3]) verbesserten *Robertson*schen Verfahren wird zerschnittenes Opium mit Wasser von 38° extrahiert. Weil die Alkaloide nicht frei, sondern an Säuren gebunden vorliegen, gehen sie hierbei in Lösung über. Der Auszug wird unter Zusatz von gepulvertem Marmor zum Sirup verdampft, dazu überschüssiges Chlorcalcium gebracht und damit einige Minuten lang gekocht. Die Basen werden hierdurch in Chlorhydrate übergeführt. Nach dem Verdünnen der erkalteten Flüssigkeit mit etwas Wasser scheiden sich Flocken von mekonsaurem Calcium und braunen

[1]) *Ladenburg*, Über das Hopein. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 783 (1886).

[2]) Über die Opiumgewinnung in Persien macht *A. F. Stahl* (Chem. Zeitschr. Bd. **64**. S. 804 [1908]) folgende Mitteilungen:

Was die Kultur des Mohnes anbetrifft, so kann dieselbe zwecks Opiumgewinnung nur dort unternommen werden, wo im Frühjahr fast keine atmosphärischen Niederschläge bei hoher Temperatur vorkommen. Der Mohn wird im November ausgesät und im Mai geerntet. Je hellere Farbe das Produkt hat, desto höher steht es im Werte. Daher werden die Einschnitte in die Mohnköpfe bei Sonnenuntergang gemacht und der ausgeflossene verdickte Saft vor Sonnenaufgang eingesammelt, da sonst das Sonnenlicht verdunkelnd auf das Produkt wirkt. Dieser Schire-Teriak (von Schir = Milch) wird in kupfernen Kesseln verschiedener Größe gesammelt, wobei die Kessel mit Ziegenhäuten verschlossen werden, und kommt so in den Handel.

Die weitere Verarbeitung des Schire-Opiums hängt davon ab, ob es für den Export oder den Verbrauch im eigenen Lande bestimmt ist. Im ersteren Falle wird das Schire-Opium auf etwa $^3/_4$ seines Quantums unter beständigem Rühren auf leichtem Kohlenfeuer eingekocht und erhält darauf einen Zusatz von Weintraubensaft und anderen nicht näher bekannten Ingredienzien. Darauf wird diese Mischung etwa drei Stunden lang bei beständigem Rühren langsam eingekocht, die so gewonnene Paste geknetet und zu kleinen Stangen ausgerollt, die in Papier gewickelt auf den Markt kommen.

[3]) *Gregory*, Neue Methode zur Abscheidung des Morphins aus dem Opium. Ann. d. Chem. Bd. **7**. S. 261.

harzartigen Substanzen ab. Man filtriert und dampft das Filtrat zur Kristallisation ein. Es scheidet sich ein Gemenge der Chlorhydrate von Morphin, Kodein und bisweilen Pseudomorphin ab, während die übrigen Alkaloide, wie im vorhergehenden wiederholt erwähnt wurde, in der schwarzen Mutterlauge gelöst bleiben. Die Kristalle werden durch Umkristallisieren aus Wasser oder Alkohol gereinigt und aus ihrer wässerigen Lösung das Morphin durch Ammoniak gefällt. Aus dem Filtrat vom Morphin kann das Kodein mit Kalilauge abgeschieden werden.

Merck[1]) extrahiert zur Morphingewinnung zerkleinertes Opium mit kaltem Wasser, verdampft den Auszug bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur zur Sirupdicke und trägt dann gepulvertes Natriumkarbonat ein, so lange sich noch Ammoniak entwickelt. Nach 24 Stunden wird der Niederschlag gesammelt, zunächst mit kaltem Wasser, dann mit 80%igem Weingeist gewaschen, schließlich in Essigsäure unter Vermeidung eines Überschusses davon gelöst. Aus der mit Tierkohle entfärbten Lösung wird die Base mit Ammoniak gefällt.

Nach *Mohr*[2]) wird ein Teil in Scheiben zerschnittenes Opium eine halbe Stunde lang mit 3 Teilen Wasser gekocht, dann nach dem Kolieren und Auspressen noch zweimal in ähnlicher Weise mit lauem Wasser behandelt. Man dampft die gesamte Lösung auf die Hälfte des Gewichtes vom Opium ein und kocht den so erhaltenen Rückstand mit $^1/_4$ Teil in Kalkbrei verwandelten Ätzkalk. Hierauf wird durch Leinwand koliert, der Rückstand ausgepreßt, noch zweimal mit Wasser angerührt und wieder gepreßt. Die gewonnenen Morphincalcium enthaltenden Flüssigkeiten werden auf das doppelte Gewicht des angewandten Opiums eingeengt, mit $^1/_{10}$ Teil Salmiak vermischt und damit kurze Zeit gekocht. Nach acht Tagen wird das in braunen Körnern ausgeschiedene Morphin gesammelt und durch Überführung in das Chlorhydrat gereinigt. Bei diesem Verfahren bleibt in der basischen, Chlorammonium enthaltenden Lösung nicht selten eine erhebliche Lösung Morphin gelöst, die, indem sie den Salmiak zersetzt, Morphinchlorhydrat zurückbildet, das sich in feinen Nadeln abscheidet.

Da der Wert des Opiums wesentlich durch dessen Gehalt an Morphin bedingt wird, so sind zur Ermittlung der Morphinmenge in demselben zahlreiche Methoden in Vorschlag gebracht worden. Am meisten zu empfehlen ist die von *Dieterich* auf Grund langjähriger Versuche ausgearbeitete Methode, welche gestattet, das Alkaloid in reiner kristallisierter Form quantitativ abzuscheiden und zur Wägung zu bringen.[3])

[1]) *Merck*, Über die verschiedenen, gegenwärtig im Handel befindlichen Opiumsorten und deren Gehalt an organischen Basen. Ann. d. Chem. Bd. **18**. S. 79; Über bengalisches Opium und einen bei der Untersuchung desselben aufgefundenen eigentümlichen Stoff. Bd. **21**. S. 202; Über *Kuklas* Verfahren zur Darstellung eines reinen und kristallisierten essigsauren Morphins. Bd. **24**. S. 46.

[2]) *Mohr*, Über die Darstellung des Morphins und seiner Salze. Ann. d. Chem. Bd. **35**. S. 119.

[3]) *E. Dieterich*, Über die Bestimmung des Morphins. Pharm. Zentralh. Bd. **31**. S. 591 (1890); Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. **29**. S. 484 (1890). — *C. Pape*, Über die Bestimmung des Morphins. Apoth.-Zeitung. Bd. **24**. S. 70 (1909).

Das Morphin kristallisiert aus der alkoholischen Lösung meistens in farblosen Säulen, verliert sein Kristallwasser bei 90—100°, schmilzt unter Zersetzung gegen 230°, ist geruchlos und von anhaltend bitterem Geschmack. Es ist unlöslich in reinem Chloroform, Petroläther, Benzin, spärlich löslich in Äther.[1]) Alkohol löst das Morphin in der Kälte schwer, bedeutend leichter beim Kochen. Morphin löst sich ferner in 1000 Teilen kalten, in 400 Teilen kochenden Wassers. In Alkalihydroxyden löst sich das Morphin leicht, in Ammoniak dagegen schwierig. Säuren nehmen Morphin leicht auf, besonders Essigsäure.

Kodein.

Das Kodein, $C_{18}H_{21}NO_3$, ist, wie auf S. 952 hervorgehoben wurde, der Methyläther des Morphins, steht also demselben chemisch sehr nahe. Es ist ein steter Bestandteil des Opiums, und zwar findet es sich im smyrnaer zu 0·2—0·3%, im bengalischen zu 0·5%, im besten persischen zu etwa 0·5—0·6%.

Bei der Darstellung des Kodeins aus Opium erhält man es nach dem Verfahren von *Roberts* und *Gregory*, wie auf S. 953 näher dargelegt wurde, gleichzeitig mit dem Morphin in Form von Chlorhydrat.[2]) Aus der wässerigen Lösung dieses Gemisches wird auf Zusatz von Ammoniak nur das Morphin gefällt, während Kodein in Lösung bleibt. Aus dem Filtrat vom Morphin scheidet man das Kodein mit Kalilauge ab. Zur Reinigung wird es noch einmal in Salzsäure gelöst, mit Wasser und Äther gewaschen und schließlich aus Äther umkristallisiert.

Zur Trennung von Morphin und Kodein kann auch die Tatsache benutzt werden, daß in genügend verdünnten Lösungen Rhodankalium nur Kodein, nicht aber Morphin fällt.[3])

L. Fouquet[4]) hat festgestellt, daß das Anisol zur Trennung beider Alkaloide sehr geeignet ist, da Morphin in kaltem Anisol unlöslich, Kodein dagegen ziemlich leicht löslich ist.

Die künstliche Darstellung des Kodeins ist leicht verständlich, wenn man berücksichtigt, daß in ihm der Methyläther des Morphins vorliegt. Man kann demnach das Morphin durch verschiedene Methylierungsmittel in Kodein überführen.

Diese Umwandlung ist zuerst *Grimaux*[5]) gelungen. Er erhielt Kodein durch Behandlung des Morphins mit Jodmethyl in Gegenwart von Alkali:

$$C_{17}H_{17}NO(OH)_2 + CH_3J + KOH = KJ + H_2O + C_{17}H_{17}NO(OH)(OCH_3).$$

[1]) *M. Marchionneschi*, Über die Löslichkeit von Morphin in Äther. Boll. Chim. Farm. Vol. **46**. p. 389 (1907).

[2]) *Gregory*, Ann. d. Chem. Bd. **26**. S. 44.

[3]) *Plugge*, Über eine neue Trennungsmethode der Opiumalkaloide. Rec. trav. chim. T. **6**. p. 157 (1887).

[4]) *L. Fouquet*, Über ein Lösungsmittel zur Trennung von Kodein und Morphin. J. Pharm. Chim. [6.] T. **5**. p. 49 (1897).

[5]) *Grimaux*, Über die Umwandlung des Morphins in Kodein und in homologen Basen. Compt. rend. T. **92**. p. 1140, 1228 (1881); T. **93**. p. 67, 217, 591 (1882).

Nach dieser Methode werden gleiche Moleküle Morphin, Natriummethylat und Methyljodid in methylalkoholischer Lösung auf 60° erhitzt. Nach Abdestillieren des Alkohols wird das Reaktionsprodukt mit Äther ausgezogen.

An Stelle von Jodmethyl können auch andere Methylierungsmittel Verwendung finden. So wird bei der technischen Gewinnung des künstlichen Kodeins nach *Knoll* das Morphin in alkoholischer Lösung mit Kaliumhydroxyd und der berechneten Menge Kaliummethylsulfat einige Zeit rückfließend gekocht. Nach dem Abdestillieren des Alkohols fügt man zur Reaktionsmasse Wasser, fällt das unveränderte Morphin mit Ammoniak aus und entzieht der Lösung das Kodein mit Benzol.

Auch das Diazomethan kann zur Methylierung des Morphins dienen. Dabei wird zweckmäßig die Erzeugung des Diazomethans und die Methylierung des Morphins zu einer Operation vereinigt, indem man in ein durch Zusatz der berechneten Menge Nitrosomethylurethan zu einer Lösung von Morphin erhaltenes Gemisch langsam die Lösung einer Base, z. B. eine alkoholische oder wässerige Kalilösung, einlaufen läßt. Hierbei tritt das durch Einwirkung der Base auf das Nitrosomethylurethan frei werdende Diazomethan im statu nascendi mit dem Morphin in Reaktion.[1] Da das giftige und leicht zersetzliche Nitrosomethylurethan für das Arbeiten im großen wenig geeignet ist, sind an seiner Stelle für die Darstellung von Kodein aus Morphin die leicht zugänglichen und sehr beständigen Nitrosoverbindungen der Monoalkyl- und Dialkylharnstoffe in Vorschlag gebracht worden.[2]

Das Kodein scheidet sich aus seiner Lösung in wasserfreiem Äther oder heißem Benzol in kleinen wasserfreien, stark glänzenden Kristallen ab, welche bei 153° schmelzen. Aus Wasser und wasserhaltigem Äther kristallisiert es mit einem Molekül Kristallwasser.

Wie das Morphin wirkt Kodein stark narkotisierend.

Apomorphin.

H_2 N . CH_3
CH_2
H
HO
CH_2
HO

CH_2 N
CH
$H_3C.O$
CH
$H_3C.O$
$CH_3.O$
$O.CH_3$

Apomorphin ähnlich dem Papaverin.

[1] Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer u. Co., Elberfeld, D. R. P. 95.644; Verfahren zur Darstellung von Kodein. Chem. Zentralbl. Jg. **1898**. I. S. 812.

[2] D. R. P. 189.843; Verfahren zur Darstellung von Alkyläthern der aromatischen Reihe. Chem. Zentralbl. Jg. **1907**. II. S. 2005.

Das Apomorphin, $C_{17}H_{17}NO_2$ entsteht durch Einwirkung wasserentziehender Mittel auf Morphin:

$$C_{17}H_{19}NO_3 = C_{17}H_{17}NO_2 + H_2O.$$

Man erhält es z. B. durch Erhitzen von Morphin mit 35%iger Salzsäure im geschlossenen Rohr auf 140—150°, ferner beim Erhitzen des Morphinhydrochlorids mit Chlorzinklösung[1]) auf 120—130°.

Apomorphin ist ein amorpher, weißer Körper, welcher an der Luft grün wird. In Wasser ist es wenig, in Alkohol und Äther leicht löslich, wodurch es sich gut vom Morphin unterscheidet. Durch Überführung des Apomorphins in die verschiedenen quaternären Salze sind neuerdings Präparate erhalten worden, die die spezifische Brechwirkung des Apomorphins besitzen, vor diesem indes den Vorzug haben, in Wasser äußerst leicht löslich zu sein und (mit Ausnahme des Jodmethylats) in Substanz wie in Lösung eine erhöhte Haltbarkeit zu zeigen.[2])

Am geeignetsten für therapeutische Zwecke erwies sich das **Apomorphinbrommethylat,** welches unter dem Namen **Euporphin** in den Handel gebracht wurde. Es besitzt vor dem Apomorphin den Vorzug, in geringerem Grade Brechreiz hervorzurufen, auf das Herz bedeutend weniger einzuwirken und länger ohne Schaden für die Kranken gebraucht werden zu können. Die Darstellung des Apomorphinbrommethylats erfolgt nach *Pschorrs* Verfahren folgendermaßen:

Apomorphin wird mit Dimethylsulfat behandelt; das zuerst entstandene methylschwefelsaure Salz des Methyl-Apomorphins wird sodann mit einer gesättigten Bromkaliumlösung umgesetzt und gleichzeitig ausgesalzen:

$$C_{17}H_{17}O_2N + (CH_3)_2SO_4 = C_{17}H_{17}O_2N{<}\begin{matrix}CH_3\\SO_4.CH_3\end{matrix}$$

$$C_{17}H_{17}O_2N{<}\begin{matrix}CH_3\\SO_4CH_3\end{matrix} + KBr = C_{17}H_{17}O_2N{<}\begin{matrix}CH_3\\Br\end{matrix} + CH_3SO_4K.$$

Der entsprechende Abkömmling des Kodeins, das Kodeinbrommethylat, kommt unter dem Namen Eukodin in den Handel.

Thebain.

Das Thebain, $C_{18}H_{21}NO_3$ oder $CH_3.N.C_{15}H_{12}O(OCH_3)_2$, welches sich im Opium in einer Menge von etwa 1% findet, steht in nächster Beziehung zum Morphin und Kodein. Es unterscheidet sich vom Morphin dadurch, daß es zwei additionelle Wasserstoffatome weniger besitzt und

[1]) *Mayer,* Einwirkung von Zinkchlorid, salpetriger Säure, Salzsäure und Chlorkalk auf Morphin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 4. S. 121 (1871).

[2]) *R. Pschorr,* Verfahren zur Herstellung leicht löslicher, haltbarer Alkylapomorphiniumsalze. D. R. P. Kl. 12 p. Nr. 158.620 vom 30. Juli 1903. Chem. Zentralbl. Jg. **1905**. I. S. 702. — *J. D. Riedel,* Aktiengesellschaft in Berlin. Verfahren zur Herstellung leicht löslicher, haltbarer Alkylapomorphiniumsalze. Zus. Pat. zu Nr. 158.620. Chem. Zentralbl. Jg. **1906**. I. S. 1067.

an Stelle der beiden Hydroxyle zwei Methoxyle enthält. Mit der Aufklärung seiner Konstitution haben sich insbesondere *M. Freund* und seine Schüler beschäftigt.[1] Zurzeit stehen für dasselbe noch die beiden folgenden Formeln zur Diskussion:

```
                CH    CH2   N.CH3
           HC      C     CH      CH2
   CH3 O.C         C     C       CH2
              C        C      CH

              O   HC      C      CH
                          O CH3
```

und

```
                    CH
       CH3 O.C              CH
               C         C
                    C              CH
     O
                    CH
                                   CH
              C          CH
                 CH2
                    CH2
                         N
  CH3 O.C         H3 C         CH
                    CH
```

Die Darstellung des Thebains aus Opium gestaltet sich folgendermaßen. Beim Behandeln des wässerigen Opiumauszuges, welcher alles Thebain enthält, mit überschüssigem Kalk geht das Thebain in der Hauptsache in den Kalkniederschlag über, dem es mit Weingeist entzogen werden kann. Der nach Abdestillieren des Alkohols verbleibende Rückstand gibt an Äther das Thebain ab. Die ätherische Lösung hinterläßt beim Verdunsten das Thebain als braune Kristallmasse. Doch sind noch andere Alkaloide beigemengt, von denen es, wie unten näher auszuführen ist, mit Hilfe von Weinsäure getrennt werden kann.

Nach *Anderson* scheidet man das Thebain aus der schwarzen Mutterlauge vom Morphin- und Kodeinchlorhydrat ab, welche bei dem auf S. 953 geschilderten Verfahren von *Robertson-Gregory* erhalten wird. Diese Mutterlauge wird mit Wasser verdünnt, mit Ammoniak gefällt und der harzige Niederschlag mit Weingeist behandelt. Dabei bleiben Narkotin und Papaverin in der Hauptsache zurück, während Thebain in Lösung geht. Der beim Verdunsten des Weingeistes bleibende Rückstand wird mit heißer Essigsäure behandelt, die Lösung mit Bleiessig vermischt. Hierbei fallen Harz, Narkotin und Papaverin aus. Aus dem Filtrat von diesen wird das Thebain mit Ammoniak abgeschieden und durch Um-

[1]) *M. Freund* und Mitarbeiter, Untersuchungen über das Thebain. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **27**. S. 2961 (1895); Untersuchungen über das Thebain. Bd. **30**. S. 1357 (1897); Untersuchungen über das Thebain. Bd. **32**. S. 168 (1899); Untersuchungen über das Thebain. Bd. **38**. S. 3234 (1905); Untersuchungen über das Thebain. Bd. **39**. S. 844 (1906).

kristallisieren gereinigt. *Hesse*[1]) trägt die oben genannte schwarze Mutterlauge in überschüssige Alkalilauge ein, wobei das Thebain mit in den Niederschlag übergeht. Beim Behandeln des letzteren mit verdünnter Essigsäure löst sich das Thebain, während Narkotin und andere Alkaloide ungelöst bleiben. Nach Behandeln der Lösung mit Tierkohle trägt man in dieselbe pulverisierte Weinsäure ein. Nun scheidet sich Thebaintartrat aus, welches nach Beseitigung der Mutterlauge durch Umkristallisieren aus kochendem Wasser gereinigt wird. Aus dem Tartrat setzt man das Alkaloid mit Hilfe von Ammoniak oder Natronlauge in Freiheit und erhält es durch Umlösen aus heißem Alkohol völlig rein.

Nach *Plugge*[2]) kann man das Thebain auch in Form des Salicylates abscheiden. Doch ist dabei Bedingung, daß in der Mischung nur die sechs wichtigsten Opiumalkaloide Morphin, Kodein, Thebain, Narkotin, Papaverin und Narcein in gereinigter Form vorliegen.

Das Thebain kristallisiert aus Alkohol in Blättchen oder in Prismen, schmilzt bei 193° und ist linksdrehend. In Chloroform und Benzol ist es ziemlich leicht, in Äther schwer, in kaltem Wasser kaum löslich.

VI. Alkaloide der Puringruppe.

Es gehören in diese Gruppe Kaffein, Theobromin und Theophyllin.

Kaffein.

1, 3, 7-Trimethyl-2, 6-dioxypurin (1, 3, 7-Trimethylxanthin):

```
CH3.N——CO
 |       |
 OC      C—N.CH3
 |       ||    >CH
CH3.N——C—N
```

Das Kaffein, $C_8H_{10}N_4O_2$, auch Koffein, Teein genannt, ist von den natürlich vorkommenden Methylderivaten das älteste und wichtigste. Es findet sich in den Blättern und Bohnen des Kaffeebaumes (0·5%), im Tee (2—4%), im Paraguaytee von Ilex paraguayensis, in der Guarana, einer aus den Früchten von Paulinia sorbilis gewonnenen Masse (gegen 5%) und in den Colanüssen (gegen 3%). In geringer Menge kommt es auch im Kakao vor.

Zur Darstellung von Kaffein aus den eben genannten Materialien sind zahlreiche Vorschriften angegeben worden.[3]) Sie haben im

---

[1]) *Hesse*, Beiträge zur Kenntnis der Opiumbasen. Ann. d. Chem. Bd. **153**. S. 61.

[2]) *Plugge*, Beiträge zur Kenntnis der wichtigsten Opiumalkaloide. Nieuwe Tijdschrift voor de pharmacie en Neederland. **1887**. p. 163.

[3]) *Péligot*, Ann. chim. phys. [3.] T. **11**. p. 139; *Mulder*, *Poggendorffs* Ann. Bd. **43**. S. 162; *Stahlschmidt*, *Poggendorffs* Ann. Bd. **112**. S. 441; *Thompson*, Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **158**. S. 365; *Heynsius*, Pharm. Zentralbl. Jg. **1850**. S. 78.

allgemeinen dieselbe Grundlage, indem das Kaffein von der Gerbsäure und anderen Extraktivstoffen durch Fällen der letzteren mittelst Bleioxyd oder anderen Basen getrennt wird. Für die Darstellung benutzt man, soweit sie nicht auf unten beschriebenem synthetischen Wege erfolgt, grünen oder schwarzen gemahlenen Tee (Teestaub). Die Blätter werden mit Wasser ausgekocht, die Flüssigkeit koliert, mit etwas überschüssigem Bleiessig gefällt oder mit Bleiglätte versetzt. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt und die vom Schwefelblei abfiltrierte Flüssigkeit verdampft, wobei die Base kristallisiert. Oder man dampft die Flüssigkeit zum Sirup ab und zieht diesen mit Benzol, mit Äther oder mit Chloroform und Äther aus. *Thompson* fällt den Teeauszug mit Bleiessig und versetzt das Filtrat nach dem Eindampfen mit überschüssigem kohlensauren Kali, wodurch das Kaffein zur Abscheidung kommt. Die unreine Base wird durch Umkristallisieren aus Alkohol, Benzol oder Chloroform mit oder ohne Zusatz von Tierkohle gereinigt.

Gegenwärtig wird das Kaffein in der Technik synthetisch aus Harnsäure dargestellt, die zu diesem Zweck aus Guano gewonnen wird. Dieser Erfolg ist auf die bekannten Untersuchungen von *E. Fischer* in der Puringruppe zurückzuführen.

Der Gang des von der Firma C. F. Böhringer & Söhne ausgeübten Fabrikationsverfahrens für das Kaffein ist durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

Harnsäure ⟶ 8-Methylxanthin ⟶ 1, 3, 7, 8-Tetramethylxanthin ⟶ 1, 3, 7-Trimethyl-8-trichlormethylxanthin ⟶ Kaffein.

Die diesen Verfahren zugrunde liegenden Methoden sind in den nachstehenden Deutschen Reichspatenten beschrieben: D. R. P. 121.224, 128.212, 146.714, 146.715, 151.133.

Kaffein kristallisiert in weißen, langen, seidenartigen Nadeln. Das aus Wasser kristallisierte Kaffein enthält 1 Mol. Kristallwasser, welches erst über 120° vollständig entweicht. Kaffein schmilzt wasserfrei bei 234—235°, sublimiert und destilliert ohne Zersetzung. Es ist wenig löslich in kaltem Wasser, Alkohol und Äther; dagegen löst es sich in Chloroform und Benzol.

Bekanntlich ist es schon seit längerer Zeit als nervenerregendes und die Herztätigkeit belebendes Mittel im Gebrauch.

Theobromin.

3, 7-Dimethyl-2, 6-Dioxypurin (3, 7-Dimethylxanthin):

```
HN —— CO
|      |
OC     C — N.CH3
|      ||      >CH
CH3.N —— C — N
```

Das Theobromin, $C_7H_8N_4O_2$, wurde 1842 von *Woskresensky* in den Kakaobohnen, und zwar in den Kotyledonen derselben entdeckt, dann von

Bley in deren Schalen nachgewiesen und später von *Schlagdenhauffen* in den Kotyledonen der Colanüsse aufgefunden. Man kann es außer auf synthetischem Wege aus der käuflichen entölten Kakaomasse darstellen. Die gebräuchlichen Kakaoarten enthalten 1—2% Theobromin.

Mitscherlich[1]) kocht die entfettete Kakaomasse mit verdünnter Schwefelsäure (30 Wasser : 1 Schwefelsäurehydrat) bis zur völligen Umwandlung des Stärkemehls in Zucker und kocht dann die Masse mit kohlensaurem Blei. Die Lösung wird alsdann durch Hefe in Gärung versetzt, nach Beendigung derselben mit Soda neutralisiert und konzentriert. Das sich ausscheidende Theobromin wird durch wiederholtes Auflösen in Salpetersäure und Fällen mit Ammoniak gereinigt.

E. Schmidt und *Pressler*[2]) vermischen die entfettete oder durch Auspressen vom Fett möglichst befreite Kakaomasse mit der Hälfte ihres Gewichtes an frisch bereitetem Kalkhydrat und extrahieren diese Mischung mit 80%igem Alkohol am Rückflußkühler. Beim Erkalten der nahezu farblosen Flüssigkeit kristallisiert ein Teil des Theobromins aus. Der Rest desselben wird durch Verdunsten des Alkohols erhalten und durch Umkristallisieren gereinigt.

Synthesen des Theobromins. Das Theobromin kann nach verschiedenen Methoden synthetisch dargestellt werden.

Man kann von Guano als dem geeignetsten Rohmaterial zur Gewinnung von Harnsäure und Guanin ausgehen. Guanin wird durch salpetrige Säure in Xanthin verwandelt und beim Erhitzen von Xanthinblei mit Jodmethyl entsteht Theobromin:

$$C_5H_2PbN_4O_2 + 2\,CH_3J \quad = \quad C_5H_2(CH_3)_2N_4O_2 + PbJ_2$$

Die Synthese aus der 3, 7-Dimethylharnsäure verläuft folgendermaßen[3]): Bei der Behandlung mit einem Gemisch von Phosphoroxychlorid und -pentachlorid verliert dieselbe das Sauerstoffatom 6 und das hierbei entstehende 3, 7-Dimethyl-2, 8-Dioxy-6-Chlorpurin wird durch Erhitzen mit Ammoniak in die entsprechende Aminoverbindung 3, 7-Dimethyl-6-Amino-2, 8-Dioxypurin verwandelt. Bei abermaliger Behandlung mit Phosphoroxychlorid wird in dieser Aminoverbindung das in Stellung 8 befindliche Sauerstoffatom gegen Chlor ausgetauscht und durch Reduktion des so entstehenden Chlorids bildet sich dann das 3, 7-Dimethyl-6-Amino-2-Oxypurin. Diese Base verliert endlich bei der Behandlung mit salpetriger Säure die Aminogruppe und es entsteht 3, 7-Dimethyl-2, 6-Dioxypurin oder Theobromin. Zwei andere einfache Verfahren bestehen darin, daß nach dem einen die 3, 7-Dimethylharnsäure durch Kochen mit Phosphoroxychlorid in Chlortheobromin übergeführt wird und daß nach dem anderen die 3-Methylharnsäure, welche

---

[1]) *Mitscherlich,* Der Kakao und die Schokolade. 1859.

[2]) *E. Schmidt* und *Pressler,* Zur Kenntnis des Theobromins. Ann. d. Chem. Bd. 217. S. 288 (1873).

[3]) *E. Fischer,* Synthese des Theobromins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 30. S. 1839 (1897).

durch direkte Methylierung der Harnsäure entsteht, in Methylchlorxanthin und dieses durch Methylierung in Chlortheobromin verwandelt wird.[1])

Einige Jahre nach dem Erscheinen der eben skizzierten *E. Fischer*schen Arbeiten hat *W. Traube* eine Methode gefunden, die Xanthinbasen direkt, d. h. ohne Vermittlung der Harnsäure, synthetisch aus einfachen Verbindungen aufzubauen.[2]) Das aus dem symmetrischen Dimethylharnstoff und Cyanessigsäure gewonnene 4-Amino-1, 3-dimethyl-uracil lieferte ihm das 1, 3-Dimethylxanthin oder Theophyllin und das 4-Amino-3-methyl-uracil aus Monomethylharnstoff das 3-Methylxanthin, welches sich nach *E. Fischer* durch Einführung weiterer Methyle leicht in Theobromin und Kaffein verwandeln läßt.

Theobromin und Theophyllin werden nunmehr von den Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. in Elberfeld auf direktem, synthetischem Wege fabrikmäßig hergestellt, nachdem in dem wissenschaftlichen Laboratorium der genannten Fabrik die *Traube*schen Methoden zur Darstellung der beiden Verbindungen weiter ausgearbeitet und in wesentlichen Punkten verbessert worden sind.

Das Theobromin wird von Friedrich Bayer & Co. in der Form von **Agurin** in den Handel gebracht, welches die Doppelverbindung des Theobrominnatriums mit Natriumacetat darstellt und als Diureticum Anwendung findet.

Theobromin stellt ein weißes, kristallinisches Pulver dar, sublimiert unzersetzt bei etwa 290°, ohne vorher zu schmelzen. Es verbindet sich mit stärkeren Säuren zu Salzen, welche meist gut kristallisieren. Andrerseits liefert es auch mit Basen salzartige Verbindungen.

Theophyllin,

1, 3-Dimethyl-2, 6-Dioxypurin (1, 3-Dimethylxanthin)

```
CH3 . N——CO
      |    |
     OC    C—NH
      |    ||    >CH
CH3 . N——C—N
```

Das dem Theobromin isomere Theophyllin wurde von *Kossel*[3]) 1888 im Tee-Extrakt entdeckt, in welchem es außer von etwas Kaffein von ge-

[1]) *E. Fischer* und *F. Ach,* Weitere Synthesen von Xanthinderivaten aus methylierten Harnsäuren. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 31. S. 1980 (1898).

[2]) *W. Traube,* Über eine neue Synthese des Guanins und Xanthins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 33. S. 1371; Der synthetische Aufbau der Harnsäure, des Xanthins, Theobromins, Theophyllins und Kaffeins aus der Cyanessigsäure. S. 3035 (1900); Der Aufbau der Xanthinbasen aus der Cyanessigsäure. Synthese des Hypoxanthins und Adenins. Ann. d. Chem. Bd. 331. S. 64 (1904).

[3]) *Kossel,* Eine neue Base aus dem Pflanzenreich. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 21. S. 2164 (1888); Über Theophyllin, einen neuen Bestandteil des Tees. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13. S. 298.

ringen Mengen Xanthin und Adenin begleitet ist. Die mit Wasser verdünnte Lösung wird mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, von harzigen Bestandteilen abfiltriert, dann mit Ammoniak übersättigt und mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt. Beim Digerieren des so erhaltenen Niederschlages mit warmer Salpetersäure gehen Theophyllin und Xanthin in Lösung. Man fällt aus der Lösung das Silber mit Schwefelwasserstoff und dunstet das mit Ammoniak übersättigte Filtrat vom Schwefelsilber ein. Hierbei scheidet sich zuerst das Xanthin, dann Theophyllin aus. Das in der letzten Mutterlauge noch enthaltene Theophyllin wird in Form der Quecksilberchloridverbindung zur Abscheidung gebracht.

Nach *Pommerehne*[1]) wird die dem Tee-Extrakt zugefügte Schwefelsäure mit Bariumkarbonat entfernt, alsdann mit Quecksilberchlorid versetzt, wodurch zunächst das Adenin beseitigt wird. In der Mutterlauge hiervon ist das Theophyllin sowie etwas Xanthin enthalten, deren Abscheidung mittelst Silbernitrat in ammoniakalischer Lösung und Auflösen des Niederschlages in warmer Salpetersäure erfolgen kann.

Für die synthetische Gewinnung des Theophyllins aus der Harnsäure ist der Fabrikationsgang analog demjenigen, wie er auf S. 960 für das Kaffein geschildert wurde, mit der Abänderung, daß das 8-Trichlormethylkaffein (= 1,3, 7-Trimethyl-8-trichlormethylxanthin) durch weitere Chlorierung in 1, 3-Dimethyl-7-chlormethyl-8-trichlormethylxanthin übergeführt wird, welches dann bei der Hydrolyse Theophyllin liefert.

Die Synthese des Theophyllins nach *Traube*, der ebenfalls technische Bedeutung zukommt, wurde bereits oben behandelt.

Das Theophyllin, welches nach den pharmakologischen Untersuchungen von *Schmiedeberg*[2]), *Ach*[3]) und *Dreser*[4]) in seiner diuretischen Wirkung das Theobromin übertrifft, wird von den Elberfelder Farbenfabriken unter dem Namen Theocin in den Handel gebracht, nachdem die Resultate der pharmakologischen Prüfung durch klinische Untersuchung Bestätigung gefunden haben.

Pilokarpin: $C_{11}H_{16}N_2O_2$.

Das Pilokarpin leitet sich zwar nicht vom Purin ab. Es steht aber zum Theobromin, Theophyllin und Kaffein insofern in Beziehung, als es, wie in den letzten Jahren gefunden wurde, gleich diesen einen Glyoxalinring enthält. Aus diesem Grunde scheint seine Besprechung an dieser Stelle gerechtfertigt.

[1]) *Pommerehne*, Über Pseudotheobromin und die damit isomeren Verbindungen, das Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin. Arch. d. Pharm. Bd. **236**. S. 113.

[2]) *Schmiedeberg*, Vergleichende Untersuchungen über die pharmakologischen Wirkungen einiger Purinderivate. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **34**. S. 2550 (1901).

[3]) *Ach*, Über die diuretische Wirkung einiger Purinderivate. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **44**. S. 319.

[4]) *Dreser*, Über das 1, 3-Dimethylxanthin und seine diuretische Wirkung beim gesunden Menschen. Berliner klin. Wochenschr. Jg. **1903**; *Pflügers* Arch. Bd. **102**. S. 1 (1904).

Die Jaborandiblätter (von Pilocarpus pennatifolius) enthalten drei Alkaloide, Pilokarpin, Pilokarpidin und Jaborin, die untereinander nahe verwandt sind. Die Trennung des Pilokarpins vom Jaborin in Form ihrer Nitrate durch Alkohol liefert zwar ein von amorphen Jaborandibasen freies Pilokarpin, jedoch ist dieses nicht ganz rein. Dagegen bietet die Fähigkeit des Pilokarpins und Pilokarpidins, sich mit fixen Alkalien zu vereinigen und dabei basische, in Äther und Chloroform unlösliche Verbindungen zu liefern, die Möglichkeit dar, zunächst diese beiden Basen von den übrigen rein abzuscheiden.[1] Man fügt der Basenmischung einen Überschuß von Natronlauge zu und schüttelt die Lösung mit Chloroform aus. Letzteres löst alle anderen Basen. In wässeriger Lösung befindet sich das Pilokarpin und Pilokarpidin, die man durch Ansäuern regeneriert. Die Trennung des Pilokarpins und Pilokarpidins ist wegen ihres analogen chemischen Verhaltens mit Schwierigkeiten verbunden. Am besten läßt sie sich noch erreichen durch fraktionierte Kristallisation der Chlorhydrate aus Alkohol.

Das durch Zersetzung seines Chlorhydrates erhaltene Pilokarpin bildet einen farblosen Sirup, ist leicht löslich in Chloroform, löslich in Alkohol und Wasser, schwer löslich in Äther, sehr schwer löslich in Petroläther. Das Drehungsvermögen des Pilokarpins beträgt für 2%ige wässerige Lösungen bei 18^0 C $[\alpha]_D = +106^0$. Es ist eine einsäurige Base.

In neuerer Zeit ist es hauptsächlich von *A. D. Jowett*[2] sowie von *A. Pinner*[3] und seinen Mitarbeitern eingehend studiert worden. Man kann Dank dieser Studien mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß ihm die Formel

$$\begin{array}{lllll}
C_2H_5.HC & \text{———} & CH.CH_2.C & \text{———} & N.CH_3 \\
\quad\; | & & \;\; | & \;\;\| & \quad \rangle CH \\
\quad OC & & CH_2 & CH & \text{———} N \\
& \diagdown\; O \;\diagup & & &
\end{array}$$

zukommt.

C. R. Marshall[4] hat die Bestandteile der Jaborandiblätter einer physiologischen Prüfung unterzogen. Pilokarpin wirkt auf die sogenannten Nerven-

[1] *A. Petit* und *M. Polonovski*, Beitrag zum Studium des Pilokarpins und Pilokarpidins. J. Pharm. Chim. [6.] T. 5. p. 370, 475 (1897).

[2] *A. D. Jowett*, Über Pilokarpin und die Alkaloide der Jaborandiblätter. Journ. chem. Soc. Lond. Vol. **77**. p. 473; Die Konstitution des Pilokarpins. S. 851 (1900); Die Konstitution des Pilokarpins. Vol. **79**. p. 580, 1331 (1901); Die Konstitution des Pilokarpins. Vol. **83**. p. 438 (1903); Die Konstitution des Pilokarpins. Überführung von Isopilokarpin in Pilokarpin. Proceedings Chem. Soc. Vol. **21**. p. 172 (1905).

[3] *A. Pinner* und Mitarbeiter, Über Pilokarpin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **33**. S. 1424, 2357 (1900); Über Pilokarpin. Bd. **34**. S. 727 (1901); Über Pilokarpin. Bd. **35**. S. 192; Über Pilokarpin. Konstitution des Alkaloids. S. 2441 (1902); Über Pilokarpin und dessen Umwandlung in eine neue Modifikation. Bd. **38**. S. 2560 (1905).

[4] *C. R. Marshall*, Physiologische Wirkung der Alkaloide der Jaborandiblätter. Journ. of Physiology. Vol. **31**. p. 120 (1904).

endigungen des Herzens; seine Wirkung ist in fast allen Punkten vergleichbar der elektrischen Reizung des Vagus. Pilokarpin und Atropin sind physiologische Antagonisten: eine kleine Dosis Atropin hebt die Wirkung großer Mengen Pilokarpin auf. Isopilokarpin wirkt wie Pilokarpin, aber schwächer. Noch weniger wirksam, aber im gleichen Sinne, erweist sich Pilokarpidin.

VII. Verschiedene Alkaloide.

Hordenin.

```
          HC    CH
         //‾‾‾‾‾‾\
HO—C<            >C-CH2.CH2.N(CH3)2
         \______//
          HC    CH
```

Das Hordenin, ein Alkaloid aus Gerstenmalz, stellte *Gaebel*[1]) in der Weise dar, daß er lufttrockenes Malz mit 96⁰/₀igem Alkohol extrahierte, das Extrakt eindickte und nach dem Lösen in Wasser und Zusatz von Kaliumkarbonat oftmals mit Äther ausschüttelte. Das rohe Hordenin wurde durch Umkristallisieren aus absolutem Äther sowie mit Hilfe von Tierkohle gereinigt. Es bildet weiße Kristalle vom Fp. 117·5° C und ist eine tertiäre Base mit ausgesprochenem Phenolcharakter. Durch das Methylieren des Hordenins mit Dimethylsulfat und darauffolgende Oxydation in alkalischer Lösung mit Kaliumpermanganat wurde das Hordenin in Anissäure übergeführt, die als solche sicher charakterisiert werden konnte. Mit Hilfe des *Hofmann*schen Abbaues (Methylieren mit Jodmethyl, Zerlegen mit Silberoxyd und trockene Destillation) wurde aus dem Hordenin Trimethylamin erhalten. Aus diesen Versuchen geht mit hoher Wahrscheinlichkeit hervor, daß das Hordenin als p-Oxyphenyldimethyläthylamin aufzufassen ist. *Gaebel* ist der Ansicht, daß das Hordenin nicht ein direktes stickstoffhaltiges Endprodukt der Zelltätigkeit der Pflanze ist, sondern daß es aus den durch Eiweißspaltung primär entstandenen Amidosäuren durch sekundäre Reaktionen sekundär gebildet wird.

Das Hordeninsulfat ist physiologisch von *Camus* untersucht worden, welcher fand, daß es den Blutdruck erhöht und die Harnausscheidung vermehrt. Fortgesetzte Einnahme bewirkt Verstopfung. Es wirkt auch auf die Galle und ruft Erbrechen hervor. Das Hordeninsulfat ist ein gutes Mittel gegen folgende Krankheiten: Hypochlorhydrie, Asystolie, Diarrhoe in heißen Ländern, Säuglingsdiarrhoe und Dysenterie, kurz, es gibt überall dort gute Resultate, wo die Gerste mit Erfolg angewandt wurde.

Auf die Herztätigkeit wirkt das Hordeninsulfat nicht mit der Energie von Digitalis u. a.; es hat den Vorzug einer weit geringeren Giftigkeit.

---

[1]) *Gaebel*, Über das Hordenin. Arch. d. Pharm. Bd. **244**, S. 435; vgl. auch Pharm. Zentralhalle. Bd. **48**. S. 427. 710 (1907).

Die gefährliche Dosis ist beim Menschen etwa 60 *g* per os und 20 *g* bei Injektionen.[1])

Solanin.

Über das Solanin finden sich in der Literatur noch ganz untereinander abweichende Angaben, die wohl darauf zurückzuführen sind, daß das Solanin verschiedener Provenienz, entgegen der bisherigen Annahme[2]), verschiedene Produkte darstellt. Vielleicht enthalten auch die Solanumarten je nach dem Vegetationszustande Verbindungen von analogem Verhalten, aber verschiedener Zusammensetzung. Bei der Extraktion von *Solanum sodomacum Linn.* nach verschiedenen Methoden, z. B. durch längeres Mazerieren mit 91%igem Alkohol, Behandeln mit 1%iger Essigsäure, dann Kalkwasser und Kochen des Niederschlags im Kohlensäurestrom mit 80%igem Alkohol, erhielten *G. Oddo* und *A. Colombano*[3]) 2·5% eines Solanins der Zusammensetzung $(C_{23}H_{39}O_8N)_2H_2O$ bzw. nach dem Trocknen bei 105° $C_{23}H_{39}O_8N$, aus 80%igem Alkohol weiße, dünne Nadeln, bei 230° sich bräunend und bei 245—250° unter Zersetzung schmelzend, sehr schwer löslich in absolutem Alkohol, mit 90%igem Alkohol gelatinierend, löslich in wässerigem Alkohol, leicht löslich in verdünnter Essigsäure, schwer löslich in Eisessig, fast unlöslich in Äther und Ligroin, schwer löslich in Aceton, ziemlich löslich in Methylalkohol. Aus dieser Lösung scheiden sich nach einiger Zeit beim Verdunsten Kristalle, Fp. 275—280°, ab.

Am besten wird zur Darstellung dieses Alkaloids folgendermaßen verfahren[4]):

Die Solanumbeeren werden in einem großen Marmormörser sorgfältig zerrieben und 24 Stunden in einem großen Gefäß zur Mazeration mit einer solchen Menge gewöhnlicher 2·5%iger Schwefelsäure stehen gelassen, daß sie vollständig davon bedeckt sind. Von Zeit zu Zeit schüttelt man die Masse durch, die alsbald schleimig wird. Nach der angegebenen Zeit filtriert man durch Wollsäckchen, drückt den Rückstand mittelst einer Presse aus, wäscht gut mit Wasser und unterwirft ihn dann einer zweiten Mazeration mit einer neuen 2·5%igen Säurelösung. Das Filtrat, das eine fast klare, gelbgefärbte Flüssigkeit darstellt, macht man mit Natron- oder Kalilauge stark alkalisch. Wird die Reaktion alkalisch, so nimmt die ganze Masse eine intensive, blutrote Färbung an und auf noch weiteren Zusatz von Alkali bildet sich sogleich beim Schütteln ein reichlicher, dichter, voluminöser Niederschlag, der sich auch gut auf Sackfiltern aus Wollgewebe sammeln läßt; nach dem Waschen mit Wasser, bis dieses fast farblos ab-

---

[1]) *J. Sabrazès* und *G. Guèrire,* Therapeutischer Wert des schwefelsauren Hordenins. Compt. rend. de l'Acad. des sciences. Vol. **147**. 1076 (1908).

[2]) Vgl. z. B. *Beilstein,* III. Aufl. Bd. **3**. S. 612.

[3]) *G. Oddo* und *A. Colombano*, Über das Solanin aus Solanum sodomacum Linn. Gaz. chim. ital. Vol. **35**. I. S. 27 (1905).

[4]) *Oddo* und *Colombano,* Über die Produkte, die man aus Solanum sodomacum Linn. extrahiert. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **38**. S. 2756 (1905).

läuft, breitet man den Niederschlag auf großen Bogen Filtrierpapier aus und läßt ihn an der Sonne oder auch auf dem Ofen trocknen. Das so erhaltene Produkt wird gepulvert und mit viel gewöhnlichem Alkohol kochen gelassen. Aus der filtrierten Lösung destilliert man etwa die Hälfte des Lösungsmittels ab, fügt zum Rückstand Wasser, bis ein Niederschlag sich zu bilden beginnt, läßt von neuem kochen und filtriert durch Papier. Beim Abkühlen setzt sich sogleich das Solanin in langen, flockigen, schönen, schmutzigweißen Nadeln ab, die man auf dem Filter sammelt und gut mit Alkohol und Wasser wäscht; man erhält sie so alsbald nur noch wenig gefärbt. Man reinigt sie durch wiederholte Kristallisation aus etwa 80%igem Alkohol.

Aus Solanum tuberosum konnte *Colombano* ein Solanin isolieren, welches von dem eben beschriebenen verschieden ist und die Formel $C_{32} H_{51} O_{11} N$ hat.[1])

Cytisin, $C_{11} H_{14} N_2 O$.

Über das Cytisin, das zum ersten Male im Jahre 1864 von *Husemann* und *Marme* aus dem Goldregen — Cytisus laburnum — isoliert wurde, liegen eine Reihe von Untersuchungen[2]) vor, die über manche Eigenschaften dieser in ihrer Konstitution noch wenig bekannten Base Aufschlüsse geben.

Cytisin wird nach folgendem, von *Partheil*[3]) ausgearbeiteten Verfahren aus *Cytisus laburnum* isoliert. Die gröblich gepulverten Samen werden mit 60%igem Alkohol, welcher mit Essigsäure angesäuert ist, extrahiert, der Alkohol abdestilliert und das in Wasser gelöste Extrakt, um Fettsubstanzen zu entfernen, durch ein genäßtes Filter filtriert. Das Filtrat wird zur Ausfällung des größten Teiles des Farbstoffes mit Bleiacetat versetzt, die filtrierte Lösung mit Kalilauge alkalisch gemacht und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Ausbeute beträgt 1·5%. *Buchka* und *Magelhaës*[4]) erhielten eine Ausbeute von ca. 3% durch Ausziehen der gemahlenen Cytisussamen mit verdünnter Salzsäure und Extrahieren der durch Eindampfen konzentrierten und alkalisch gemachten Lösung mit

[1]) *Colombano,* Über das aus den Samen von Solanum tuberosum Lin. extrahierte Solanin. Atti R. Accad. dei Lincei, Roma. [5.] Vol. **16.** II. p. 683 u. 755. Chem. Zentralbl. Jg. **1908.** I. S. 473 u. 651.

[2]) *A. Partheil,* Über Cytisin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **23.** S. 3201 (1890); Über Cytisin. Bd. **24.** S. 634 (1891); Cytisin und Ulexin. Arch. d. Pharm. Bd. **230.** S. 231. — *v. Buchka* und *Magelhaës,* Über Cytisin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **24.** S. 253, 674 (1891). — *Plugge,* Über die Identität von Saphorin und Cytisin. Arch. d. Pharm. Bd. **232.** S. 444. — *M. Freund* und *A. Friedmann,* Zur Kenntnis des Cytisins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **34.** S. 605 (1901). — *E. Maaß,* Beiträge zur Kenntnis des Cytisins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41.** S. 1635 (1908).

[3]) *A. Partheil,* Über Cytisin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **24.** S. 634 (1891).

[4]) *Buchka* und *Magelhaës,* Über Cytisin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **24.** S. 255 (1894).

Chloroform. Das Alkaloid bleibt beim Verdunsten des Chloroforms als ein beim Erkalten schnell kristallinisch erstarrendes Öl zurück. Es wird durch wiederholtes Umkristallisieren aus absolutem Alkohol nahezu farblos erhalten. Cytisin kristallisiert in großen, wasserklaren Kristallen vom Siedepunkt 152—153° (unkorrigiert). Es ist sublimierbar, sehr leicht löslich in Wasser, Alkohol, Benzol, Chloroform, ziemlich leicht in Äther, Amylalkohol, Aceton, aber unlöslich in Schwefelkohlenstoff, kaltem Ligroin und Tetrachlorkohlenstoff. Kochendes Ligroin löst die Base unter Zurücklassung der Farbstoffe und scheidet sie beim Erkalten wieder ab, weshalb sich dieses Lösungsmittel zur Reinigung kleiner Mengen gut eignet. Cytisin ist optisch aktiv, und zwar zeigt eine 1·99%ige Lösung bei 17° die Drehung $[\alpha]_D = -119° 57'$. Eine 1·985%ige Lösung des Nitrates zeigt bei 17° $[\alpha]_D = -82° 37'$.

Cheirolin, $C_5 H_9 O_2 NS_2$.

Dieses dürfte wohl die erste in einer Droge gefundene, schwefelhaltige Pflanzenbase sein. Ähnliche Verbindungen scheinen in geringer Menge in vielen Cruciferenarten vorhanden zu sein, und auf ihre Anwesenheit ist wohl die Schwefelreaktion von verschiedenen Ölen zurückzuführen.

Das Cheirolin wird aus dem Samen des Goldlacks (Cheirantus cheiri) gewonnen. Die Extrakte dieser Pflanze wurden schon lange in der Medizin verwendet und das Streben der Forscher ging dahin, die wirksame Substanz dieses Extraktes zu isolieren. Zuerst gelang es *Reeb*[1]), aus dem Samen des Goldlacks einen Cheirinin benannten Körper vom Schmelzpunkt 73 bis 74° C zu isolieren. *Ph. Wagner*[2]) verfuhr anfangs nach *Reebs* Angaben, konnte aber nur sehr geringe Mengen des von ihm beschriebenen Körpers gewinnen. *Reeb* extrahierte die Samen des Goldlacks zur Entfernung des darin enthaltenen Öles zuerst mit Benzin, zog den Rückstand mit Alkohol aus und isolierte daraus sein Cheirinin. Auf Grund verschiedener Beobachtungen schlug *Wagner* das im folgenden beschriebene Verfahren ein und erhielt dabei größere Mengen des neuen schwefelhaltigen Cheirolins. Die Samen des Goldlacks wurden fein gestoßen, mit einer 5%igen Sodalösung befeuchtet und direkt mit Äther erschöpft. Dieser nimmt das Öl der Samen mit dem Alkaloid auf. Letzteres wird der eingeengten ätherischen Lösung mittelst 5%iger Schwefelsäure entzogen. Nachdem sich die Säure von dem gelbgefärbten, stark ölhaltigen Äther getrennt hat, wird sie abgelassen, filtriert und nach Zusatz ca. 5%iger Sodalösung mit wenig Äther geschüttelt. Das Alkaloid geht in den Äther über, der nach dem Abdestillieren einen klaren, beim Reiben mit dem Glasstab erstarrenden Sirup hinterläßt. Dieser wird unter Anwendung von Tierkohle aus Äther

[1]) *Reeb,* Weitere Untersuchungen über die wirksamen Bestandteile des Goldlacks (Cheiranthus Cheiri L.). Arch. f. experim. Path. Bd. **43**. S. 131.

[2]) *Ph. Wagner,* Über Cheirolin, ein schwefelhaltiges Alkaloid. Chem.-Zeitg. Bd. **32**. S. 76 (1908).

umkristallisiert. Die filtrierte Ätherlösung scheidet beim Stehen große, farblose Kristalle von Cheirolin aus. Dieselben schmelzen nach dem Trocknen im Exsikkator bei 46—48°. Die Ausbeute beträgt $^1/_4$—$^1/_2$% der angewendeten Samen.

Dem Cheirolin, das antipyretische, chininähnliche Wirkung aufweist, kommt nach Untersuchungen von *Schneider*[1]) die Formel $C_5 H_9 O_2 NS_2$ zu. Unter Berücksichtigung der von ihm festgestellten Tatsache, daß das Cheirolin eine chemisch neutrale Substanz ist, wird sich die oben beschriebene Darstellungsweise erheblich vereinfachen lassen.[2])

---

[1]) *W. Schneider*, Zur Kenntnis des Cheirolins, des schwefelhaltigen Alkaloids aus dem Goldlacksamen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 4466 (1908); Bd. **42**. S. 3416 (1909).

[2]) *W. Schneider*, Zur Kenntnis des Cheirolins, des schwefelhaltigen Alkaloids aus dem Goldlacksamen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 4466 (1908).

Darstellung der Saponine.

Von **R. Kobert.**

Unter Saponinen oder Saponinsubstanzen versteht man eine Gruppe von stickstofffreien Glykosiden, welche durch eine Reihe physikalischer, chemischer und physiologischer Eigenschaften[1], falls man diese alle zusammen berücksichtigt, genügend charakterisiert sind, während wir über die Struktur ihrer Kernsubstanzen so gut wie nichts wissen. Und doch haben die Saponine ein erhebliches pflanzenphysiologisches Interesse, da sie sich in 52 Familien der Mono- und Dikotylen finden.

Um die Darstellungsmethoden verständlich zu machen, sind die nachstehenden Vorbemerkungen erforderlich.

Was die physikalischen Eigenschaften anlangt, sind die Saponine farblose, bis auf Digitonin, Parillin, Sarsasaponin und Cyclamin amorphe und kolloide Substanzen des Pflanzenreiches, welche sich in Wurzeln (Senega, Saponaria rubra, Saponaria alba, Chamaelirium), Zwiebeln (Chlorogalum), Knollen (Cyclamen), Rinden (Quillaja, Guajacum), Früchten (Sapindus), Samen (Aesculus, Thea, Entada, Agrostemma), Stengeln (Dulcamara), Blättern (Guajacum), manchmal auch in der ganzen Pflanze (Anagallis, Herniaria) finden. Optisch sind sie teils linksdrehend (Sarsaparillglykoside), teils rechtsdrehend (Kornradensaponine), teils inaktiv (Assamin). Den Eiweißstoffen ähneln sie in mehreren Beziehungen. Erstens dialysieren nämlich ihre Lösungen nur sehr schwer und unvollkommen. Zweitens lassen sie sich aus wässerigen Lösungen zum Teil sehr leicht, zum Teil schwerer aussalzen. Drittens halten sie energisch kleine Mengen anorganischer Substanzen fest, so oft man sie auch durch Dialyse oder Umfällung reinigen mag. Viertens reißen sie beim Ausfallen analog einzelnen Eiweißstoffen gewisse gelöste Farbstoffe begierig an sich. Fünftens teilen sie mit den Eiweißarten die Neigung, in neutralen und namentlich in schwach alkalischen Lösungen seifenartig zu schäumen und in konzentrierten Lösungen wie Gummi arabicum Gegenstände aus Papier, Holz, Kork etc. aneinander zu kitten. Von ihrer seifenähnlichen Verwendbarkeit haben einige ihrer Stammpflanzen die Namen Saponaria, Sapindus, Sapota, Quillaja (d. h. Waschmittel) und die Glykoside selbst den Namen Saponine. Die Verwendbarkeit unserer Drogen als Waschmittel haben unabhängig von einander die verschiedensten

[1]) *R. Kobert*, Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. Mit 6 Figuren und 13 Tabellen. Stuttgart 1904.

Urvölker entdeckt. Da die empfindlichsten Farben der zu waschenden Gewebe und die feinsten Gewebsfäden von den Saponinen nicht angegriffen und verändert werden, haben sie vor Seifen gewisse Vorzüge, und dies sichert ihnen dauernde Verwendung in der Technik und im Haushalt bei der Reinigung kostbarer Gewebe. Auch als schaumerzeugende Mittel für Schaumgetränke werden sie trotz polizeilicher Verbote immer wieder benutzt. Da alle stark schäumenden Substanzen große Emulsionskraft besitzen, werden die Saponine auch zum Emulgieren von Fetten, wie Lebertran und Rizinusöl, weiter von Harzen und Teerpräparaten benutzt. Mit der emulgierenden Eigenschaft hängt die Fähigkeit unserer Substanzen zusammen, einerseits kristallinische Substanzen am Auskristallisieren zu hindern und andrerseits fein verteilte Pulver und CO_2 in wässerigen Medien suspendiert zu halten, so daß also beispielsweise Bleisulfid und Baryumsulfat in saponinhaltigen wässerigen Lösungen nicht ordentlich ausfallen und CO_2 nicht entweicht.

Von den physiologischen Eigenschaften, an denen die meisten Saponine leicht zu erkennen sind, sei ihre ganz spezifische Giftigkeit für Fische, ihr scharfer, nachhaltig kratzender Geschmack, ihre entzündungerregende Wirkung auf die verschiedensten Schleimhäute, auf das Unterhautzellgewebe, auf die Niere etc. der Warmblüter und ihre farbstoffentziehende Kraft für rote Blutkörperchen hervorgehoben. Nur 2—3 von allen Saponinen sind von Haus aus fast oder ganz ungiftig. Über die Entgiftung der von Haus aus giftigen wird noch gesprochen werden.

Von chemischen Eigenschaften werden die wichtigsten bei den Darstellungsmethoden erwähnt werden. Hier seien nur folgende im voraus besprochen. Unsere Stoffe sind teils von neutraler, teils von saurer Reaktion. Merkwürdigerweise kommen in mehreren Pflanzen gleichzeitig je ein saures und ein neutrales Saponin vor, z. B. im Kraute von Anagallis, in der Quillajarinde, in der Senegawurzel, in den Samen des chinesischen Tees und des Assamtees, in den Kornradensamen, in der Guajakrinde etc. Die Azidität der sauren Saponine ist aber nicht durch ein Karboxyl bedingt und daher meist recht schwach. Von alkalisch reagierenden Saponinen kann man nur im erweiterten Sinne des Wortes reden, insofern die einzige hierher gehörige Substanz, das Solanin, nicht stickstofffrei ist und ihre Basizität natürlich gerade diesem Stickstoffgehalte verdankt. Das Solanin bildet somit die Brücke zwischen den eigentlichen Saponinen und den Alkaloiden. Ein Vorkommen von echten Saponinstoffen neben Fetten, ätherischen Ölen, Harzen etc. ist in den Mutterdrogen nicht selten. Ein Vorkommen neben Alkaloiden ist, falls man vom Solanin absieht, bei unseren Stoffen sehr selten, so daß man den Eindruck gewinnt, daß beide Gruppen von Substanzen sich gegenseitig ausschließen.

In Äther, Petroläther, Benzol, Chloroform sind die echten primären Saponine fast unlöslich, die nicht kristallinischen auch in absolutem kalten Alkohol. In Wasser sind die neutral reagierenden, nicht kristallinischen leicht löslich, ja zum Teil sind sie sehr hygroskopisch und zerfließen an der Luft. In heißem verdünnten Alkohol und in heißem Methylalkohol scheinen alle

Saponine löslich zu sein. Die sauer reagierenden Saponine werden in Wasser zum Teil erst bei Zusatz von Spuren von Alkali klar und leicht löslich.

Es gibt 3 Methoden der Entgiftung der Saponine auf chemischem Wege. Erstens bilden sämtliche Saponine mit den Cholesterinen und Phytosterinen, wie *Ransom*[1]) für ein Saponin fand und *Hausmann*[2]), *Abderhalden* und *Le Count*[3]), *Kobert*[4]) u. a. jenen Fund erweiternd bestätigt haben, ungiftige Verbindungen von zum Teil so labilem Charakter, daß mittelst Äther sich das Cholesterin der Verbindung wieder entziehen läßt. Eine dieser Verbindungen, die von Digitonin und Cholesterin, läßt sich jedoch nach *Windaus*[5]) mittelst einfacher Ätherbehandlung nicht zersetzen. Sie ist ferner bis jetzt fast das einzige kristallinische Saponincholesterid. Es bildet sich aus einem Molekül Digitonin und einem Molekül Cholesterin ohne Wasseraustritt nach der Formel $C_{55}H_{94}O_{28} + C_{27}H_{46}O = C_{82}H_{140}O_{29}$. Eine zweite Methode der Entgiftung wohl sämtlicher Saponine besteht in Erhitzung derselben mit heißer Barythydratlösung und nachheriger Wiederabtrennung vom Baryt durch Kohlensäure und Schwefelsäure. Eine dritte Methode der Entgiftung besteht in der Umwandlung der Saponine in Acetylsaponin und Regenerierung daraus. Ich komme auf diese beiden Methoden unten bei den Darstellungsmethoden zu sprechen. Hier sei nur bemerkt, daß sich unverändertes giftiges Saponin nur aus den nach der ersten Methode entgifteten Saponinen wieder gewinnen läßt.

Von Gruppenreaktionen der Saponine nenne ich folgende:

1. Eine frisch hergestellte Lösung von Ferricyankalium, der ein Tropfen Eisenchlorid zugesetzt worden ist, färben sie langsam schon in der Kälte und schnell beim Erwärmen erst grün, dann blau. Ohne Zweifel beruht diese Färbung auf einer Reduktion entweder des Eisenchlorids oder des Ferricyankaliums. Ebenso wird Kaliumpermanganat schon in der Kälte reduziert.

2. Eigentliche Zuckerreaktionen geben sie mit Silbersalzen, Kupfersalzen etc. an sich bei vorsichtigem Erhitzen nicht, wohl aber nach hydrolytischer Spaltung sehr stark. *Fehling*sche Lösung wird von konzentrierteren Saponinlösungen wenn nicht schon in der Kälte so doch wenigstens beim Erwärmen getrübt und durch Bildung von Saponinkupfer gallertig gefällt. Einzelne Saponine, und zwar besonders das Assamin, färben nach *Halberkann*[6]) die *Fehling*sche Lösung intensiv grün, und zwar noch bei 6000facher Verdünnung. Nickel- und Kobaltsalzlösungen geben ebenfalls charakteristische Färbungen, und zwar gelbe.

---

[1]) *Ransom*, Saponin und sein Gegengift. Deutsche med. Wochenschr. 1901. S. 194.

[2]) *Hausmann*, Über die Entgiftung des Saponins durch Cholesterin. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **6**. S. 567 (1905).

[3]) *Abderhalden* und *Le Count*, Zeitschr. f. experim. Path. u. Ther. Bd. **2**. S. 199.

[4]) *Kobert*, Beiträge etc. S. 52.

[5]) *A. Windaus*, Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Ber. der Deutsch. chem. Ges. Jg. **42**. S. 238 (1909).

[6]) *Halberkann*, Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen der Samen des Assamtees. Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 313 (1909).

3. Werden Saponinlösungen mit Sublimatlösung einige Zeit gekocht, so erfolgt beim Erkalten Trübung und Abscheidung eines weißen, sich mit Ammoniak schwärzenden Niederschlags. Es hat also Reduktion zu Kalomel stattgefunden.

4. Erhitzen mit *Nesslers* Reagens färbt nach *Vamvakas*[1]) farblose Saponinlösungen erst gelb, dann grau und trübt sie alsdann. Falls reichlich Saponin anwesend war, entsteht ein grauer Niederschlag, und die darüber stehende Flüssigkeit gelatiniert nach *Halberkann.*[2])

5. Gerbsäuren, wie die aus Galläpfeln, Katechu, Dividivi, Eichenrinde, Myrobalanen, Quebracho und Sumach, fällen konzentrierte Lösungen nur einzelner Saponine, wie z. B. der Guajaksaponine; wohl aber wirkt Bleiessig auf sehr viele fällend. Neutrales Bleiacetat läßt die Lösungen der neutralen Saponine klar, fällt aber die sauren. Einige wenige Saponine sind durch Bleisalze überhaupt nicht fällbar.

6. Konzentrierte Lösung von Baryumhydroxyd bringt in nicht zu verdünnten wässerigen Lösungen aller durch Bleiessig fällbaren Saponine einen weißen Niederschlag von Barytsaponin hervor. Diese Reaktion wird auch mikrochemisch zur Drogenuntersuchung nach *Combes*[3]) verwendet. Man trägt die Schnitte in Barytwasser ein, wäscht sie mit Kalkwasser aus und legt sie dann in Lösung von Kaliumdichromat. Dabei bilden sich in saponinhaltigen Zellen meist Kristalle von Baryumchromat. *Halberkann*[4]) hat die Brauchbarkeit dieser Methode bestätigt.

7. Mit konzentrierter Schwefelsäure färben sich nach *Rosoll*[5]) alle Saponine, wenn dieses Gemisch, auf Uhrgläschen ausgebreitet, der Luft ausgesetzt wird, unter Wasseranziehung langsam von den Rändern her rot. Einige zeigen besonders mit Selenschwefelsäure (*Meckes* Reagens) eine Violettfärbung, so z. B. die Guajaksaponine nach *Frieboes*[6]) und die Assamteesaponine nach *Halberkann.*[8])

Schwefelsäure, der Alkohol und eine Spur Eisenchlorid zugesetzt worden ist (*Lafons* Reagens), färbt einzelne Saponine[7]) blaugrün oder blau oder gibt eine grüne Fluoreszenz.[8]) Zum Nachweis von Saponinen in Schnitten von Drogen sind *Lafons* Reagens und für einzelne auch *Meckes* Reagens recht brauchbar.

---

[1]) *Vamvakas,* Annal. Chim. anal. appl. p. 161 (1906); ref. in *Mercks* Reagenzienverzeichnis. II. Aufl. Berlin 1908. S. 264.

[2]) *Halberkann,* Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 312 (1909).

[3]) *Combes,* Comptes rendus de l'acad. de sciences. T. **145**. p. 1431; Journ. de Pharm. et de Chim. T. **27**. p. 247 (1908).

[4]) *Halberkann,* Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 13 des erweiterten Sep.-Abdr. (1909).

[5]) *Alex. Rosoll,* Beiträge zur Histochemie der Pflanzen. Sitz.-Ber. d. Wiener Akad. d. Wissensch. Bd. **89**. II. Abt. S. 143 (1884).

[6]) *Walther Frieboes,* Beiträge zur Kenntnis der Guajakpräparate. Mit Vorwort von *R. Kobert.* Stuttgart 1903. S. 55.

[7]) *R. Kobert,* Zur *Lafon*schen Digitalinreaktion. Pharmaz. Zeitg. Jg. **1885**. Nr. 67. *Frieboes,* l. c. S. 55.

[8]) *Halberkann,* Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 311 (1909).

Was die chemische Zusammensetzung der Saponine anlangt, so ist in dieser Beziehung dank *Kiliani*[1]) am genauesten die des Digitonins bekannt. Das im Handel befindliche Präparat ist amorph und wasserlöslich, aber nicht rein. Das ganz reine bildet in Wasser schwer lösliche, in starkem Alkohol aber gut lösliche Kristalle von der Formel $C_{54}H_{92}O_{28}$ oder $C_{55}H_{94}O_{28}$. Diese gründet sich sowohl auf Analyse und Molekulargewichtsbestimmung des Digitonins selbst als auf quantitative Bestimmung seiner Spaltstücke. Bei Hydrolyse mittelst verdünnter Salzsäure in der Hitze zerfällt es nach *Kiliani*[1]) nach der Formel

$$\underset{\text{Digitonin}}{C_{54}H_{92}O_{28}} + 2\,H_2O = \underset{\text{Digitogenin}}{C_{30}H_{48}O_6} + \underset{\text{Glukose}}{2\,C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Galaktose.}}{2\,C_6H_{12}O_6}$$

Von den Abbauprodukten des Digitogenins hat *Kiliani* eine ganze Anzahl in Kristallen darstellen können, so die Digitogensäure, Desoxydigitogensäure, Oxydigitogensäure, Digitsäure, Anhydrodigitsäure, Digsäure, Digitosäure, Hydrodigitosäure u. a. Von den sonstigen Saponinen ist in chemischer Hinsicht vor kurzem das Agrostemmasapotoxin durch *Brandl*[2]) sehr eingehend untersucht worden; auch gelang es ihm, ein kristallinisches Spaltungsprodukt zu gewinnen.

Die chemische Zusammensetzung der übrigen Saponine ist zwar für viele durch die Elementaranalyse ermittelt worden; jedoch bilden die so gewonnenen Zahlen meist nur Annäherungswerte. Stellt man diese nach ihrem Kohlenstoffgehalt geordnet nebeneinander, so ergeben sich zwei natürliche Reihen, in welche sich die Mehrzahl dieser Substanzen annähernd einreihen lassen. Die eine von *Flückiger*[3]) aufgestellte hat die allgemeine Formel $C_n H_{2n-10} O_{18}$ und umfaßt bis jetzt nur wenige Glieder; die andere, von mir[4]) aufgestellte, hat die Formel $C_n H_{2n-8} O_{10}$ und umfaßt eine weit größere Anzahl von Gliedern. Die Molekulargewichtsbestimmung zeigt, daß bei mehreren Saponinen, wie z. B. bei denen der Sarsaparille[5]), das Molekül ein größeres ist als der einfachste Ausdruck dieser Formel vermuten läßt. Die hydrolytische Zerlegung beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren ergibt stets eine sauer reagierende, in angesäuertem Wasser unlösliche Substanz, die die Gruppenbezeichnung Sapogenin führt, sowie mehrere Zuckerarten, die keineswegs bei allen Saponinen dieselben sind. Wie oben angeführt wurde, liefert das Digitonin Glukose und Galaktose. Galaktose konnte *Hoffmann*[6])

[1]) *Kiliani*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **23**. I. S. 1555 (1890); Jg. **24**. I. S. 339 und II. S. 3951 (1891); Jg. **32**. S. 341 und 2202 (1899); Jg. **34**. S. 3562 (1901); Archiv d. Pharm. Bd. **231**. S. 448 (1893). — *Windaus* freilich bevorzugt die andere Formel (s. das Zitat auf S. 972).

[2]) *J. Brandl*, Über Sapotoxin und Sapogenin von Agrostemma Githago. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **54**. S. 245 (1906); Bd. **59**. S. 245 (1908); Bd. **59**. S. 299 (1908).

[3]) *A. Flückiger*, Über das Saponin der Sarsaparille. Arch. d. Pharm. Bd. **210**. S. 532 (1877).

[4]) *R. Kobert*, Über die allgemeine Saponinformel. Arbeiten d. pharmakol. Institutes zu Dorpat. Bd. **6**. S. 29 (1891).

[5]) *W. v. Schulz*, Zur Kenntnis der Sarsaparille. Ebenda. Bd. **14**. S. 28 (1896).

[6]) *P. Hoffmann*, Über die Quillajasäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 2734 (1903).

auch aus der Quillajasäure reichlich abspalten neben einem nicht vergärbaren Zucker, der unabhängig von ihm auch von *Plzak*[1]) und später von *Rosenthaler*[2]), *May*[3]), *Brandl*, *Halberkann*[4]) etc. gefunden wurde und der sich als Pentose (Arabinose) erwies. Sein Vorkommen ist bis jetzt schon in 14 verschiedenen Saponinen sichergestellt. Auch Methylpentosen scheinen in Saponinen vorkommen zu können. Von Saponasen, d. h. von Enzymen, welche die Zerlegung der Saponine in ihren Stammpflanzen in Sapogenin und Zuckerarten auszuführen vermögen und die gewiß in größerer Zahl existieren, kennen wir noch kein einziges genauer. Bakterien- und Schimmelpilzenzyme scheinen dazu befähigt zu sein. *Gonnermann*[5]) konnte mittelst Emulsin und Tyrosinase eine kräftige Zuckerabspaltung aus von mir dargestelltem Quillajasapotoxin bewirken. Ebenso hatte dieser Autor bei Versuchen an Organen von Säugetieren ein positives Resultat zu verzeichnen, da er mittelst Hasenleber sterile Spaltung von Sapotoxin auszuführen vermochte.

Viele Sapogenine sind in Alkohol und in Eisessig gut löslich, schwerer in Äther und in Chloroform und unlöslich in Ligroin und in Wasser. *Brandl*[6]) reinigte das Kornradensapogenin durch Lösen in Essigäther. Auch in freien Alkalien sind die Sapogenine bis zum gewissen Grade löslich. Vom chemischen Standpunkte aus sind die Sapogenine noch weniger ein einheitlicher Begriff, als die Saponine es sind, da nicht nur die Sapogenine verschiedener Saponine verschieden sind, sondern da aus einem und demselben Saponine je nach dem Druck, unter dem die Spaltung vorgenommen wird, ferner je nach der angewandten Säure, nach deren Konzentration und nach der Länge des Kochens recht verschiedene Sapogenine erhalten werden, wie *Halberkann*[7]) soeben von neuem festgestellt hat. Der genannte Autor konnte zeigen, daß bei energischem weiteren Kochen mit Mineralsäuren (H_2SO_4) auf dem anfänglich abgeschiedenen Sapogenin des Assamins eine Fettsäure abgespalten wird. Bei der Spaltung des Solanins haben *Hilger* und *Merkens*[8]) Krotonaldehyd als Spaltungsprodukt bekommen. Die Sapogenine lassen sich zum Teil in Kristallen gewinnen; auch eine als Sapogeninkalium bezeichnete Verbindung zeigt nach einigen Autoren kristallinischen Charakter. *Brandl*[9]) hat beim weiteren Abbau des Sapogenins der Kornradensaponine durch Zusammenschmelzen mit Kalihydrat eine in Sodalösung leicht lösliche Säure $C_{30}H_{46}O_4$ erhalten, deren Entstehen er

[1]) *Fr. Plzak,* Über Cyclamin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 1761 (1903).

[2]) *Leop. Rosenthaler,* Pentosenreaktionen von Saponinen. Archiv der Pharmazie. Bd. **243**. S. 247 (1905).

[3]) *Otto May,* Chemisch-pharmakognostische Untersuchung der Früchte von Sapindus Rarak. Dissert. Straßburg 1905.

[4]) *Halberkann,* Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 324 (1909).

[5]) *M. Gonnermann*, Über das Spaltungsvermögen von Leberhistozym und einiger anderen Enzyme für Glykoside und Alkaloide. *Pflügers* Archiv. Bd. **113**. S. 185 (1906).

[6]) *Brandl,* Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **54**. S. 252 (1906).

[7]) *Halberkann,* Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 330 (1909).

[8]) *A. Hilger* und *Merkens,* Über das Solanin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 3204 (1903).

[9]) *Brandl,* Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **59**. S. 256 u. 267 (1908).

auch im Darmkanal von Hunden nach Fütterung von Kornradensapotoxin nachweisen konnte. Andere Autoren haben durch Oxydationsmittel Oxalsäure, Benzoesäure, Pikrinsäure erhalten. *Sänger*[1]) hat durch Einwirkung von heißer Kalilauge aus Agrostemmasapotoxin Protokatechusäure, Brenzkatechin, Essigsäure und Propionsäure erhalten.

Erst nachdem alles Vorhergehende besprochen ist, werden die Darstellungs- und Trennungsmethoden der Saponine genügend verständlich werden.

1. Die älteste ist die Alkoholmethode, mit Unrecht als die von *Schrader*[2]) bezeichnet. Nach dieser wird der betreffende Pflanzenteil, z. B. die Wurzel der Saponaria officinalis, mit Spiritus ausgekocht, das Dekokt heiß filtriert und dann stark abgekühlt, wobei sich zunächst die neutral reagierenden Saponine unlöslich abscheiden. Wie später von mir gefunden wurde, sind nämlich die sauren Glykoside in Alkohol löslicher; sie können durch Zusatz von absolutem Alkohol und sodann von Äther ebenfalls zur Abscheidung gebracht werden (Quillajasäure, Guajaksaponinsäure etc.). Durch Wiederholung der Prozedur läßt sich eine gewisse Reinigung wohl erzielen; zu analysenreinen Substanzen kommt man jedoch damit allein nicht. In Anlehnung an einen Vorschlag von *Greene*[3]) kann man die *Schrader*sche Methode dadurch verbessern, daß man die auszukochenden zerkleinerten Pflanzenteile mit Magnesia usta mischt, welche Pflanzensäuren bindet und dadurch deren Übergang in den Alkohol verhindert. Anhangsweise muß bei Besprechung der *Schrader*schen Methode noch darauf hingewiesen werden, daß die vier kristallinischen Saponine sich zu Alkohol und zu Wasser beinahe umgekehrt verhalten als die amorphen. Parillin ist in absolutem Alkohol am besten löslich, in verdünntem viel schlechter. In kaltem Wasser ist es unlöslich, in kochendem aber leicht löslich, und nach dem Erkalten bildet es eine übersättigte Lösung. Setzt man zu dieser Alkohol, so wird die Löslichkeit des Glykosides nicht nur nicht erhöht, sondern es wird ausgefällt. In wässerigen Lösungen des Sarsasaponins löst sich nach *Schulz*[4]) das Parillin viel besser als in Wasser. Das Melanthin der Nigella sativa verhält sich nach *Schulz* dem Parillin ganz analog. Auch die Angaben von *Kiliani*[5]) über das Digitonin zeigen, daß es sich ähnlich verhält. In mancher Beziehung gehört endlich auch das Cyclamin der Alpenveilchenknolle hierher, welches nur 1 : 500 in Wasser klar löslich ist.

2. Die Methylalkoholmethode von *W. G. Boorsma.*[6]) Nach dieser werden die vorher entfetteten Pflanzenteile mit Methylalkohol extra-

[1]) *Karl Sänger*, Beiträge zur chemischen Charakteristik der Samen der Kornrade im Hinblick auf ihre Bedeutung als Bestandteil der Mehlsorten des Handels. Dissert. München 1904.

[2]) *Schrader, Gehlens* allgem. Journ. d. Chemie. Bd. 8. S. 548 (1808).

[3]) *Greene*, Über Chamaelirium luteum. Amer. Journ. of Pharm. Vol. 50. p. 250 (1878).

[4]) *W. v. Schulz*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Sarsaparille. Arbeiten des pharmakologischen Institutes zu Dorpat. Bd. 14. S. 1 (1896).

[5]) *Kiliani*, l. c.

[6]) *Boorsma*, Mededeelingen ait s' lands plantentuin. Bd. 52. S. 30 (1902).

hiert, der alle Saponine gut zu lösen scheint. Aus dem filtrierten Auszuge wird das gelöste Saponin durch Zusatz von Äther ausgefällt und der Niederschlag in Chloroformwasser gelöst der Dialyse unterworfen, wobei mitgelöste Salze, Zucker etc. entfernt werden und das Saponin allein zurückbleibt. Es wird aus der eingeengten wässerigen Lösung durch Alkoholäther niedergeschlagen. Ist es ein Gemisch eines sauren und eines neutralen Saponins, so wird zur Trennung die weiter unten beschriebene Bleimethode von *Kobert* angewandt.

3. Die Methode des Aussalzens gewisser Saponine habe ich[1]) angegeben, um ein Gemisch von Quillajasäure und Quillajasapotoxin voneinander zu trennen, denn das erstgenannte saure Saponin kann durch Sättigen der wässerigen Lösung eines Gemisches beider mittelst Ammonsulfat in der Hitze leicht entzogen werden, da es quantitativ ausfällt, während das Sapotoxin gar nicht gefällt wird. Niederschlag und Lösung werden dann je in einen Dialysator gebracht, wobei das Ammonsulfat und etwaige sonstige, als Verunreinigung anwesende Salze wegdialysieren, während die Saponinsubstanzen im Dialysator bleiben. Selbst milligrammatische Mengen kann man dadurch ausfällen. Die Guajakrindensaponinsäure und die Polygalasäure lassen sich ebenfalls noch aus nur 0·1—0·2%igen Lösungen mittelst Ammonsulfat abscheiden, die Cereinsäure sogar aus noch verdünnteren. Auch das saure Saponin der Saponaria officinalis ist auf diese Weise fällbar. Von neutralen Saponinen ließen sich z. B. Chamälirin, Sarsasaponin, Cyclamin und das Sapotoxin der weißen Seifenwurzel ebenfalls aussalzen. Alle diese lassen sich dann natürlich mit Hilfe der Dialyse weiter reinigen.

4. Die Methoden des Ausschüttelns. Die von *Dragendorff* angegebene Methode des Ausschüttelns mit Chloroform aus saurer Lösung ist nicht zu empfehlen, da dies Lösungsmittel nur Spuren unserer Stoffe aufnimmt. Besser ist schon Isobutylalkohol oder Amylalkohol, in denen sich z. B. Chamälirin 0·5%ig und Quillajasäure 0·2%ig, die meisten neutralen Saponine aber noch nicht 0·1%ig klar lösen. Wo es sich um Abscheidung sehr kleiner Mengen, z. B. aus Bier oder Brauselimonade, handelt, da kann diese Methode mit in Frage kommen. Den Übergang in das Ausschüttelungsmittel kann man durch Zusatz von Ammonsulfat zur erhitzten wässerigen Lösung begünstigen. Essigäther ist zum Ausschütteln bzw. zum Aufnehmen des eingeengten Saponins ebenfalls empfohlen worden; ich vermag jedoch dieser Empfehlung nicht beizutreten. Das zurzeit anerkannteste Ausschüttelungsmittel ist das von *Brunner*[2]) empfohlene Phenol als Acidum carbolicum liquefactum, namentlich wo es sich um den Nachweis kleiner Mengen in Schaumgetränken handelt. Für dieses Verfahren treten

[1]) *R. Kobert*, Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904. S. 20. Vgl. *W. v. Schulz*, Dorpater Institutsarbeiten. Bd. 14. S. 21 (1896).

[2]) *Karl Brunner*, Saponine in moussierenden Getränken. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 5. S. 1197 (1902).

Baumert[1]) und *Rühle*[2]) ein; es ist auch in das Schweizerische Lebensmittelbuch[3]) aufgenommen worden. Nach diesem Verfahren wird die auf Saponin zu untersuchende Flüssigkeit eingeengt; falls sie sauer ist, wird sie mit Magnesiumkarbonat neutralisiert. Der Sirup wird mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, filtriert, das Filtrat mit Tierkohle gereinigt und der Alkohol abgedunstet. Der in Wasser aufgenommene Verdunstungsrückstand wird mit soviel Acidum carbol. liquef. unter Schütteln versetzt, daß etwa 5 cm^3 des Phenols nicht vom Wasser gelöst werden. Zusatz von Ammonsulfat unterstützt den Übertritt des Saponins in das Phenol und die Abscheidung des letzteren. Das mit Hilfe des Scheidetrichters abgetrennte Phenol wird nun mit Wasser und Äther, dem das halbe Volumen Petroläther zugemischt worden ist, geschüttelt, wobei das Saponin in das Wasser überwandert und durch Verdunsten relativ rein gewonnen werden kann. Wie genau die Methode ist, zeigen die Analysen von *Rühle*. Weitere Angaben darüber werden von *Halberkann* demnächst veröffentlicht werden.

5. Die Methode der Acetylierung und der Regeneration aus der Acetylverbindung ist namentlich zur weiteren Reinigung des nach den ersten beiden Methoden gewonnenen Rohsaponins und zur Beschaffung analysenreinen Materials von *Stütz*[4]) erdacht. *Stütz* hat die Acetylierung der Quillajasaponine in dreierlei Weise vorgenommen: 1. durch Kochen von 1 Teil Saponin mit 4 Teilen Essigsäureanhydrid während einer halben Stunde am Rückflußkühler; 2. durch Kochen von 1 Teil Saponin, 1 Teil Natriumacetat und 4 Teilen Essigsäureanhydrid während einer Stunde am Rückflußkühler; 3. durch Kochen von 5 Teilen Saponin, 2 Teilen Chlorzink und 4 Teilen Essigsäureanhydrid eine Stunde lang am Rückflußkühler. Zum Zwecke der Acetylierung werden von *Halberkann*[5]) etwa 5 *g* des Rohassamins mit 7·5 *g* entwässertem Natriumacetat sorgfältig gemischt, in 30 *g* Essigsäureanhydrid eingetragen, für 5 Stunden auf 120—130° erhitzt und nach dem Abkühlen in Wasser gegossen. Nach 24 Stunden werden die erstarrten Massen zerstoßen, mit Wasser gewaschen, in Alkohol gelöst, wenn nötig mit Kohle entfärbt, noch heiß filtriert und verdunstet. Der Verdunstungsrückstand wird in Chloroform gelöst, mit Ligroin gefällt und auf Tonplatten über Kalilauge getrocknet. Es ist unlöslich in Wasser und bildet das möglichst hoch acetylierte Saponin. Die Regenerierung des Assamins aus dem Acetylassamin geschah mittelst Kochen in alkoholischer Kalihydratlösung. Die Regenerierung der Saponine der Quillajarinde bei *Stütz* geschah in der unten noch zu besprechenden Weise durch Kochen mit Baryumhydroxyd. Genug, in beiden Fällen resultierte ein schneeweißes, sehr asche-

[1]) *Georg Baumert*, Lehrb. d. gerichtl. Chemie. II. Aufl. Braunschweig 1907. Bd. **1**. S. 390.

[2]) *Joh. Rühle*, Über den Nachweis von Saponin. Zeitschr. f. Untersuch. der Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. **16**. S. 165 (1908).

[3]) Schweizerisches Lebensmittelbuch. Bern 1907. Abschnitt 4. S. 17.

[4]) *Ed. Stütz*, Über das Saponin. Annalen der Chemie. Bd. **218**. S. 231 (1883).

[5]) *Halberkann*, Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 316 (1909).

armes Saponin, welches *Stütz* in seinem Falle als besonders rein ansprach. Ich konnte jedoch durch Untersuchung des Originalpräparates von *Stütz* sowie durch Selbstdarstellung eines solchen regenerierten Saponins der Quillajarinde mich überzeugen, daß dieses Präparat mit dem Ausgangsmaterial, d. h. mit dem Quillajasapotoxin pharmakologisch gar keine Ähnlichkeit mehr hatte, denn es war gänzlich wirkungslos sowohl für Blutkörperchen im Reagenzglase als für Tiere bei Einspritzung. Dasselbe konnte ich für das von *Halberkann* aus dem Acetylassamin regenerierte Assamin nachweisen. Es kann somit keinem Zweifel unterliegen, daß die regenerierten Saponine chemisch mit den Ausgangssubstanzen nicht identisch sind, sondern wie *Halberkann* vermutet, höchstwahrscheinlich eine Fettsäure- und zwar z. B. Buttersäuregruppe weniger enthalten. Daß beim Behandeln der Saponine mit Alkalien Buttersäure abgespalten wird, wurde schon vor Jahrzehnten von *Rochleder* konstatiert und später die Abspaltung von Fettsäuren von *Weil* [1]) und von *May* [2]) bestätigt. Damit kommt die *Stütz*sche Methode der Darstellung von reinen unveränderten Saponinsubstanzen aus den Acetylderivaten gänzlich in Wegfall.

6. Die Methode der Umwandlung der Rohsaponine in Barytsaponine und die Abspaltung von reinen Saponinen daraus ist schon vor fast 50 Jahren von *Rochleder* und *v. Payr* [3]) eingeführt und seitdem zahllose Male angewandt worden. Sie beruht darauf, daß alle Saponine in konzentrierteren Lösungen mit heiß gesättigter Lösung von Baryumhydroxyd einen voluminösen weißen Niederschlag liefern, der sich mit Barytwasser sowie mit Kalkwasser auswaschen läßt und aus Barytsaponin besteht. Zerlegt man diesen mit gerade hinreichenden Mengen von Schwefelsäure, so entsteht ein Niederschlag von Baryumsulfat, und das Filtrat enthält, so meint man meist, reines Saponin. Ich habe nun nachweisen können, daß die Originalpräparate der nach dieser Methode von *Dragendorff* dargestellten Saponine kaum oder gar nicht wirkten. Auch die von *P. Hoffmann* [4]) durch energische Barytbehandlung gewonnenen Saponine waren wirkungslos. Das gleiche konnte ich für das von *Halberkann* aus dem Barytassamin abgespaltene Assamin nachweisen, auch wenn die Einwirkung des kochend heißen Baryumhydroxydes nur eine Stunde gedauert hatte. *Halberkann* [5]) ist auch hier geneigt, Änderungen im Molekül anzunehmen, da das vom Baryt befreite Assamin *Fehling*sche Lösung reduzierte, was es vor der Barytbehandlung nicht getan hatte. Unter solchen Umständen muß auch die Barytmethode zur Darstellung von chemisch reinen Saponinen als unbrauchbar in Wegfall kommen. Ich habe oben bei Besprechung der

---

[1]) *Ludwig Weil*, Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen und ihrer Verbreitung. Dissert. Straßburg 1901.

[2]) *May*, l. c. (s. das Citat oben auf S. 975).

[3]) *Rochleder* und *v. Payr*, Wiener Akad. Sitzungsberichte. Mathem.-naturwissenschaftliche Klasse. Bd. **45**. II. S. 7 (1862).

[4]) *Hoffmann*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **36**. S. 2726 (1903).

[5]) *Halberkann*, Biochem. Zeischr. Bd. **19**. S. 4 des erweiterten Separatabdruckes (1909).

Regenerierung der Saponine aus der Acetylverbindung das dazu von *Stütz* verwendete Verfahren deshalb nicht weiter ausgeführt, weil ich es hier mit besprechen wollte. Es besteht nämlich im Zerkochen der Verbindung mit Barythydrat und Fällung des freigemachten Saponins als Barytsaponin. Daß dabei unwirksame Substanzen entstehen, kann uns nun nicht mehr wundern.

7. Die Methode der Umwandlung der Saponine in Benzoylverbindungen nach *v. Schulz* [1]) und nach *Rosenthaler* [2]) und die Regenerierung daraus sollte nach gewöhnlichen chemischen Vorstellungen ebenfalls brauchbar sein, ganz reine Saponine darzustellen. Da jedoch die Benzoylierung bei Anwesenheit starker Natronlauge vorgenommen werden muß, und da Natronlauge, wie wir vorhin sahen, aus Saponinen wenigstens in der Wärme leicht eine Fettsäure abspaltet, steht zu befürchten, daß diese Methode ebenfalls unwirksame Saponine liefern muß. Der exakte Beweis der Unwirksamkeit eines nach dieser Methode gereinigten Saponins liegt jedoch noch nicht vor.

8. Die Methode der Umwandlung in die Cholesterinverbindung und Wiederabspaltung daraus nach den Angaben von *Windaus* [3]) dient namentlich zur genaueren Bestimmung der Formel und der Molekülgröße. Im Gegensatz zu den Methoden der Umwandlung in die Acetylverbindung und die Benzoylverbindung findet weder bei der Cholesteridbildung noch bei der Aufspaltung eine Änderung des Moleküls statt, so daß also auch von einer Einbuße an toxischer Wirkung geschweige denn von einer gänzlichen Entgiftung keine Rede ist. Diese Methode wird daher sehr bald eine große Bedeutung gewinnen. Sie setzt voraus, daß das Saponin nach einer der anderen Methoden bereits vorgereinigt ist. Alsdann versetzt man die etwa 1%ige Lösung des Saponins in Alkohol mit einer 1%igen Lösung von Cholesterin in Alkohol. Einige Saponincholesteride fallen dabei quantitativ als unlöslicher Niederschlag aus. Andere bleiben in Lösung und machen dadurch die Erkennung des Endpunktes des Zusatzes der Cholesterinlösung schwierig. Man muß dann eben einen Überschuß von Cholesterin zusetzen, kurze Zeit erhitzen und zur Trockne eindampfen. Das dabei entstehende feste Cholesterid ist in Wasser unlöslich und kann daher mit Wasser gewaschen und von allen dem Saponin anhängenden Verunreinigungssubstanzen befreit werden. Bisweilen bildet es gute Kristalle. Die Zerlegung mancher Saponincholesteride geschieht schon durch einen Überschuß von Äther; die anderen verseift man vorsichtig, um das Saponin abzuspalten.

9. Die Bleimethode nach *Bley* [4]), erweitert nach *Kobert*. [5]) Diese Methode gestattet, gleichzeitig aus derselben Droge ein saures und ein

---

[1]) *W. v. Schulz*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Sarsaparille. Arbeiten d. pharmakologischen Institutes zu Dorpat. Bd. 13. S. 34 (1896).

[2]) *Rosenthaler*, Phytochem. Untersuchung der Fischfangpflanze Verbascum sinuatum. Diss. Straßburg 1901, S. 93.

[3]) *Windaus*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 42. S. 238 (1909).

[4]) *Bley*, Über Saponin. Annalen d. Chem. u. Pharm. Bd. 4. S. 283 (1832).

[5]) *R. Kobert*, Über Quillajasäure. Ein Beitrag zur Kenntnis der Saponingruppe. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 23. S. 233 (1887).

neutrales amorphes Saponin rein zu gewinnen. Man entfernt dabei zunächst durch Petroläther oder Äther etwaiges Fett und, falls auch noch ein kristallisierendes wasserunlösliches Saponin vorhanden sein sollte, wie z. B. bei der Sarsaparille, mittelst kaltem 96%igem Alkohol auch dieses. Alsdann kocht man die Droge wiederholt mit Wasser aus, vereinigt die neutralisierten, heiß filtrierten Filtrate, engt sie ein und fällt sie mit neutralem Bleiacetat, welches neben anderen Stoffen die sauren Saponine quantitativ niederschlägt. Das klare Filtrat wird sofort mit Bleiessig nochmals gefällt. Dieser Niederschlag enthält die Gesamtmenge der neutralen Saponine. Die beiden Niederschläge werden mit dem durch Wasser verdünnten Fällungsmittel ausgewaschen, zwischen Filtrierpapier einigermaßen getrocknet, dann in destilliertem Wasser suspendiert und mittelst Schwefelwasserstoff entbleit, nachdem die Hauptmenge des Bleis schon vorher durch verdünnte Schwefelsäure entfernt und abfiltriert worden ist. Die Abscheidung des Schwefelbleis wird durch Erwärmen und Alkoholzusatz befördert. Alsdann wird filtriert und beiden Filtraten nach dem Einengen zum Sirup die Alkoholauskochung des Schwefelwasserstoffniederschlages beigefügt. Ohne diese Maßnahmen verliert man beträchtliche Mengen namentlich des sauren Saponins, da dieses am Schwefelblei durch Adsorption zu haften pflegt. Einzelne Saponine scheinen von einem Überschuß von Schwefelwasserstoff irgendwie zersetzt zu werden. Die beiden wässerig-alkoholischen Gemische werden fast zur Trockne gebracht, mit heißem Alkohol ausgekocht und das Filtrat nach dem Abkühlen mit Äther versetzt. Der sich zum Teil schon vor, zum Teil erst nach dem Ätherzusatz bildende weiße Niederschlag ist in der neutralen Bleiacetatportion das saure Saponin und in der Bleiessigportion das neutrale. Eine Abschwächung der Wirksamkeit der Saponine findet bei richtiger Handhabung dieser Methode der Darstellung nicht statt. Selbstverständlich beruht auch diese Methode auf einer zeitweisen Umwandlung in eine Verbindung, nämlich in eine neutrale Bleioxydverbindung (bei den sauren Saponinen) bzw. in eine basische (bei den neutralen Saponinen). Diese beiden Verbindungen sind der Baryumverbindung analog, haben vor dieser aber den Vorzug, bei der Zersetzung, wie schon vorhin gesagt wurde, keine veränderten und dadurch unwirksam gewordenen Saponine zu liefern. Nach dieser Methode wurden gewonnen: die Quillajasäure und das Quillajasapotoxin aus der Quillajarinde, die Polygalasäure und das Senegin aus der Senegawurzel, die Saporubrinsäure und das Saporubrin aus der roten Seifenwurzel, die Agrostemmasäure und das Agrostemmasapotoxin aus den Kornradensamen, die Assamsäure und das Assamin aus den Samen des Assamtees, die Guajaksaponinsäure und das neutrale Guajaksaponin aus der Guajakrinde etc. Daß es Saponine gibt, welche durch Blei nicht fällbar sind, wurde schon S. 975 erwähnt; neben sauren Saponinen scheinen solche aber nie in derselben Pflanze vorzukommen. Ihre Abscheidung erfolgt nach der Methylalkoholmethode.

Die Gewinnung der ätherischen Öle.

Von **Konrad Bartelt**, Berlin.

Unter den Produkten, die von dem Tier- bzw. Pflanzenkörper erzeugt werden, befinden sich neben gasförmigen oder festen Körpern in großer Menge ölige Bestandteile. Befeuchtet man mit diesen Ölen ein Stück Papier, so wird auf demselben ein durchscheinender Fleck erzeugt, der entweder beim Liegen an der Luft alsbald verschwindet oder dauernd auf dem Papier bestehen bleibt. Im ersteren Falle verdunstet das Öl verhältnismäßig leicht und wir bezeichnen ein solches als „ätherisches Öl", während das auf dem Papier einen dauernden Fleck hervorrufende Öl als „fettes Öl" bezeichnet wird. Mit der leichten Verdunstungsfähigkeit der ätherischen Öle an der Luft steht ihre Eigenschaft, mit Wasserdämpfen unschwer überzugehen, in naher Beziehung, und da man die ätherischen Öle schon seit langer Zeit auf diesem Wege gewinnt, bezeichnet man im allgemeinen als „ätherisches Öl" die Gesamtheit der bei der Wasserdampfdestillation von Pflanzen oder Pflanzenteilen mit den Wasserdämpfen überdestillierenden Verbindungen. Der Tierkörper erzeugt ebenfalls, wie schon angedeutet wurde, eine große Anzahl von Ölen, die jedoch fast alle zu den „fetten Ölen" zu gehören scheinen, wenigstens wurden ätherische Öle bisher nicht aus Tierkörpern gewonnen; wir müssen uns daher bei der Besprechung ihrer Gewinnung usw. vollständig auf diejenige aus den Pflanzen beschränken.

Die Methoden, welche zur Gewinnung der ätherischen Öle aus den Pflanzen angewandt werden, haben auf verschiedene Umstände, deren Erörterung alsbald erfolgen soll, Rücksicht zu nehmen. In erster Linie muß im Auge behalten werden, daß die anzuwendenden Operationen keine Veränderung des Öles hervorrufen dürfen, oder wenigstens nur solche nebensächlicher oder erwünschter Natur; ferner wird aber auch das Vorkommen des Öles, d. h. der Ort, an dem es in der Pflanze aufgespeichert ist und wieweit es geschützt an diesen Stellen liegt, von Bedeutung sein. Es sollen deshalb, bevor auf die Methoden, welche hauptsächlich zur Gewinnung der ätherischen Öle dienen, näher eingegangen wird, zuerst das Vorkommen der Öle in der Pflanze, sodann die Zubereitung des Rohmaterials, die jeder weiteren Verarbeitung voraufgehen muß, besprochen werden.

Vorkommen der ätherischen Öle in der Pflanze.

Die ätherischen Öle sind im Gegensatz zu den fetten Ölen, welche ernährungsphysiologisch eine ganz ähnliche Rolle wie die Kohlehydrate spielen, für die Ernährung der Pflanze völlig bedeutungslos. Es wird daher im Interesse der Pflanze liegen, diese Endprodukte des Stoffwechsels möglichst aus ihrem Körper herauszubefördern oder sie wenigstens an Stellen unterzubringen, die von den durch den Pflanzenkörper zirkulierenden Säften abgeschlossen sind, zumal nicht wenige ätherische Öle für die Pflanze direkt giftige Wirkungen haben können. Diese Giftigkeit schützt hingegen die Pflanze wieder gegen Tierfraß, so daß die Pflanze dadurch, daß sie das ätherische Öl an die Oberfläche ihres Körpers befördert, direkten Nutzen hat. Auch spielt das häufig angenehm, fast immer intensiv riechende Öl sicherlich eine bedeutsame Rolle bei der Anlockung von Insekten, die den Befruchtungsvorgang durch Übertragen von Pollenkörnern von den männlichen auf die weiblichen Blüten vermitteln.

Die Bestandteile der ätherischen Öle, wie sie nach der Wasserdampfdestillation gewonnen werden, sind in den weitaus meisten Fällen in Wasser unlöslich. Es ist dadurch natürlich ein Transportieren innerhalb der Pflanze außerordentlich erschwert, was schon frühzeitig zu der Annahme Veranlassung gab, daß die Pflanze die ätherischen Öle, bevor sie dieselben in einer in Wasser unlöslichen Form abscheidet, in Form von wasserlöslichen Verbindungen durch ihren Körper befördert. Diese Annahme hat sich in der Tat für mehrere Fälle nachweisen lassen, so z. B. für die Glykoside. Diese sind ätherartige Verbindungen zwischen Alkoholen und Glukosen. Da die Glukosen in der Pflanze stets vorhanden sind — sie sind bekanntlich die Umwandlungsform der Stärke, die ebenfalls wegen ihrer Unlöslichkeit in Wasser in erstere übergeführt wird —, ist dieser Weg zur Beförderung der unlöslichen Alkohole für die Pflanze ein außerordentlich bequemer. Sobald das Glykosid an der Stelle angekommen ist, wo das ätherische Öl abgelagert werden soll, tritt durch Fermente seine Spaltung in die beiden Komponenten ein. Der abgeschiedene Alkohol kann dann durch Wasserabspaltung bzw. Reduktion in einen Kohlenwasserstoff oder durch Oxydation in einen Aldehyd bzw. in die entsprechende Säure oder in ein Keton übergeführt werden. Wir erhalten dadurch als Bestandteile ätherischer Öle in chemischer Hinsicht die verschiedenartigsten Verbindungen, die durch Veresterung der Säuren etc. noch vermehrt werden können.

Für diese eben beschriebenen ätherischen Öle ist der Ort ihrer ersten Darstellung von dem Orte ihrer endgültigen Ablagerung verschieden. In vielen Fällen bleibt das ätherische Öl aber auch unmittelbar an den Stellen seiner Darstellung liegen. Da die Menge des abgeschiedenen Öles oft eine ziemlich bedeutende ist, werden von der Pflanze zu seiner Unterbringung besondere Räume hergestellt. Während die zu einem Gewebe verbundenen Zellen im Jugendstadium lückenlos aneinanderschließen, werden allmählich durch Abrundung der Zellen Zwischenräume gebildet, die man als „Inter-

zellularräume“ bezeichnet. Die Ursache der Spaltung der Zellen voneinander liegt in der Verquellung der aus pektinartigen Stoffen bestehenden primären Zellwandung. Die auf solche Weise gebildeten Zwischenräume bezeichnet man als „schizogene Interzellularen“, die durch verschieden lebhaftes Wachstum der Wände der umliegenden Zellen zu größeren Kammern oder Gängen umgebildet werden können, und diese dienen dann in vielen Fällen als Aufbewahrungsort für die ätherischen Öle. Von den schizogenen Interzellularen unterscheidet man die „lysigenen“, die durch Auflösung von Zellwänden entstanden sind. Führen letztere ätherisches Öl, so gehen sie aus Zellgruppen hervor, aus denen sich schon vorher diese Stoffe gebildet, deren Wände sich dann allmählich aufgelöst haben; die Sekretbildung findet nach Untersuchungen von *Tschirch* in einer besonderen Schicht, der sogenannten „resinogenen Schicht“, statt. Daß schizogen angelegte Interzellularen durch Auflösung der benachbarten Zellen lysigen erweitert werden, ist ferner eine häufig beobachtete Erscheinung. Diese Sekretbehälter bilden dann unregelmäßige Hohlräume in den Geweben und werden durch Verkorkung der Wände der umliegenden Zellen von den vom Zellsaft durchflossenen Zellen völlig abgeschlossen. Da die Interzellularen oft in unmittelbarer Nähe der Epidermis liegen, durchbrechen sie diese häufig und münden dann nach außen, wobei das ausfließende ätherische Öl, zumal wenn es mit Harzen oder Gummischleim vermischt ist, für die Pflanze als Schutz gegen Austrocknung oder Angriffe von Parasiten dienen kann. Die Zahl dieser Harzkanäle ist in einigen Fällen eine außerordentlich große: sie kann auf dem Quadratzentimeter bis zu 50 und noch darüber betragen.

Über die Bildung der ätherischen Öle in der Pflanze ist man noch wenig unterrichtet. Theoretisch läßt sich die Entstehung der Bestandteile der ätherischen Öle leicht durch Annahme einer Wasserabspaltung oder Reduktion aus Kohlehydraten erklären, und da die Pflanze die letzteren vermittelst des Chlorophylls in Form von Stärke und den Umwandlungsprodukten derselben, den Glykosiden, in großer Menge darstellt, ist die Annahme wohl berechtigt, daß die ätherischen Öle aus den Kohlehydraten entstehen. Eventuell bilden auch Eiweißstoffe für einen Teil besonders der stickstoffhaltigen Produkte das Ausgangsmaterial. Eine besondere Stütze finden diese Annahmen in dem häufigen Auftreten von freien Säuren, besonders auch Oxalsäure, im Zellsafte. Die aus den Kohlehydraten bzw. Eiweißstoffen durch eben erwähnte Reaktionen primär entstehenden Verbindungen werden natürlich aliphatische Struktur aufweisen. Da aber verhältnismäßig nur sehr wenig Bestandteile ätherischer Öle aliphatische Struktur besitzen, müssen die zyklischen Verbindungen erst sekundär dargestellt werden. Die Ursache dieser Umwandlung haben wir wahrscheinlich in den freien Säuren zu sehen, vermittelst deren es auch im Laboratorium möglich ist, monozyklische Verbindungen, die sich in den ätherischen Ölen finden, aus den entsprechenden aliphatischen darzustellen. Aus den monozyklischen Körpern die in der Natur so weit verbreiteten

bizyklischen — wie z. B. Pinen, Camphen, Sabinen, Borneol, Santalol, Campher etc. — zu gewinnen, ist bisher noch nicht gelungen; der Mißerfolg ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß wir im Laboratorium nicht über so milde Invertierungsmittel verfügen, wie sie der Pflanze in den äußerst verdünnten Lösungen von Säuren in ihrem Zellsaft zur Verfügung stehen. Daß hierbei gerade die Oxalsäure, eventuell auch Kieselsäure der Pflanze außerordentlich dienlich sind, ist eine Annahme, zu der wir auf Grund der glatten Invertierungen, die man in anderen Fällen mit diesen Säuren im Laboratorium ausführen kann, ohne gleichzeitig größere Veränderungen der Moleküle zu bewirken, wohl berechtigt ist.

Das ätherische Öl ist in einigen Fällen über alle Organe der Pflanze verbreitet, während man wiederum Pflanzen findet, die nur in einigen wenigen ihrer Organe Öl aufgespeichert enthalten. Die Träger des Öles sind dann gewöhnlich die Blätter und Wurzeln, die fast immer in dieser Richtung eine bevorzugte Stellung einnehmen, während die Blüten, obwohl sie oft hervorstechenden Geruch besitzen, einen in prozentischer Hinsicht nur geringen Vorrat von Öl aufweisen. Neben den erwähnten Organen führen aber auch Samen, Rinde, Stengel und Holz ätherisches Öl. So ist das in der Technik eine so wichtige Rolle spielende Sandelholzöl hauptsächlich im Kernholz von Santalum album enthalten; in anderen Fällen verarbeitet man hinwiederum nur die Blüten oder die Samen.

Unter den phanerogamen Pflanzen gibt es nur wenige, aus denen man bisher kein ätherisches Öl gewinnen konnte; die Kryptogamen sind nach dieser Hinsicht wohl weniger untersucht, doch auch unter ihnen finden sich — z. B. in den Lebermoosen — Vertreter, die nicht unbeträchtliche Mengen von ätherischem Öl enthalten. Von den Phanerogamen zeichnen sich besonders Pflanzen der Familien Labiatae, Cruciferae und Umbelliflorae sowie die Coniferen aus, die fast ausnahmslos große Mengen ätherischen Öles enthalten, während man bei anderen Familien einige Vertreter mit reichen Ölmengen neben anderen mit sehr wenig und teilweise ganz verschiedenem ätherischen Öl findet. Es scheint somit ein Zusammenhang botanisch sehr nahe stehender Pflanzen in bezug auf die Ähnlichkeit in der Hervorbringung chemisch verwandter ätherischer Öle nicht zu bestehen. Nehmen wir an, daß ehemals nahe verwandte Pflanzen auch chemisch ähnliche Öle in prozentisch gleicher Menge hervorzubringen vermochten, eine Annahme, die wohl berechtigt ist, so müssen wir folgern, daß durch äußere Einflüsse eine solche Veränderung in der Pflanze hervorgerufen worden ist, daß die Ölabsonderung völlig verändert wurde, während sich die Art und Weise der geschlechtlichen Fortpflanzung unverändert erhielt. Wie weit die Hervorbringung ätherischer Öle von der Ernährung abhängig ist, läßt sich durch einfache ernährungs-physiologische Versuche mit Leichtigkeit erweisen. Durch anders gestaltete Ernährung läßt es sich z. B. erreichen, daß eine Pflanze eine Verbindung, welche sie unter sonstigen Verhältnissen in sehr großer Menge hervorgebracht hat, nur noch in geringerer, ja sogar überhaupt nicht mehr zu erzeugen vermag, während

dafür neue Bestandteile in dem Öle auftreten können. Aber nicht nur die Ernährungsweise, sondern auch alle sonstigen äußeren Einflüsse, wie Klima, Feuchtigkeit der Luft und des Bodens, hoch oder niedrig gelegener Standort usw., wirken auf den Stoffwechsel der Pflanze bestimmend ein. In manchen Fällen werden nur die Bestandteile in einigen Organen der Pflanze, die nicht immer die gleichen zu sein brauchen, verändert, in anderen Fällen tritt eine durchgreifende Änderung des gesamten Öles ein.

Die Schwankungen in dem Gehalt an ätherischem Öl in einer Pflanze gehen sogar noch weiter, wie bereits in dem vorhergehenden Abschnitt angedeutet wurde. So ist z. B. das ätherische Öl, das im Frühjahr erzeugt wird, von dem im Sommer und im Herbst gebildeten gewöhnlich verschieden; je nachdem es wertvoller ist, wird die Pflanze frühzeitig oder später verarbeitet. Sogar die Tageszeit, an der der Pflanzenteil abgepflückt wird, ist von nicht geringer Bedeutung. Es spielen hierbei fermentative Wirkungen eine bedeutsame Rolle. Ob es während des Einsammelns der Pflanze regnet oder ob die Sonne scheint, ist z. B. für die Feinheit des Rosenparfüms durchaus nicht gleichgültig. Auch hat beim Rosenöl die Gewinnung möglichst sogleich nach dem Abpflücken der Blüten stattzufinden, da die sonst eintretenden fermentativen Zersetzungen unerwünschte Produkte erzeugen, während man in anderen Fällen durch längeres Lagern absichtlich erst Veränderungen herbeiführt — ich erinnere an das Auftreten des angenehmen Heugeruchs (Cumarin) beim Trocknen von abgemähtem Gras auf Wiesen.

Da die angeführten Arten des Vorkommens von ätherischem Öl in der Pflanze für die Technik der Gewinnung sehr bedeutungsvoll sind, mußte auf sie an dieser Stelle näher eingegangen werden, um das Verständnis für die gebräuchlichen Gewinnungsmethoden der qu. Öle zu ermöglichen. Aber außer den angeführten Ursachen wird der Zweck, zu dem man das dargestellte ätherische Öl gebrauchen will, für die Art der Gewinnung eine große Rolle spielen. Da es nach keiner der zu besprechenden Methoden möglich sein wird, das gesamte Öl ohne jede Veränderung zu erhalten, ja da es sogar in einigen Fällen erwünscht sein kann, nicht alle, sondern nur einige, und zwar die gerade die nützlichste Rolle spielenden Bestandteile möglichst isoliert zu erhalten, werden die Gewinnungsmethoden immer darauf hinzielen müssen, diese Verbindungen in unveränderter Form und quantitativer Ausbeute zu isolieren, eventuell unter Verlust von weniger wertvollen Produkten. Der letztere Fall wird besonders da Anwendung finden, wo es sich um Darstellung feiner Parfüms handelt. Diese sind gewöhnlich das Produkt außerordentlich vieler und dabei oft nur in geringer Menge vorkommender Verbindungen, so daß bei Zerstörung von nur einem oder einiger weniger dieser Anteile, die in prozentischer Hinsicht durchaus nicht ins Gewicht fallen, die Feinheit des Aromas völlig vernichtet und damit das Öl wertlos geworden sein kann. Soll das Öl in der Medizin Anwendung finden, so muß man natürlich darauf bedacht nehmen, daß die pharmakologisch wirksamen Verbindungen quantitativ und unverändert erhalten werden.

Vorbereitung der Rohstoffe.

Da nur in sehr seltenen Fällen die ganze Pflanze gleichzeitig zur Darstellung von ätherischem Öl gebraucht wird, müssen diejenigen Teile der Pflanze, welche in Bearbeitung genommen werden sollen, durch Abpflücken und Sammeln gewonnen werden. Es ist nicht immer möglich, eine sofortige Verarbeitung des Materials an Ort und Stelle vorzunehmen, da die Fabrikanlagen natürlich in mehr oder weniger weiter Entfernung von dem Orte, an dem die Pflanzenteile geerntet werden, liegen können. Nur wenn es sich um Holzteile handelt, aus denen das ätherische Öl dargestellt werden soll, können die Stämme ohne vorbereitende Arbeiten an den Ort der Fabrik gebracht werden. Blätter, Blüten, junge Zweige usw. werden aber gewöhnlich erst getrocknet, damit die ätherischen Öle nicht durch die bei Gegenwart von Wasser alsbald eintretenden Zersetzungen beim Lagern zerstört werden können; gleichzeitig hat der Transport getrockneter Pflanzen großen Vorzug, da die mitzutransportierenden Wassermengen eine Verteuerung des Rohmaterials durch Frachtunkosten herbeiführen würden, die bei einer überseeischen Ladung ziemlich erheblich werden können. Läßt sich ein Trocknen der Pflanzenteile nicht vornehmen, wenn z. B. trotz größter Vorsichtsmaßregeln Zersetzung eintreten oder ein zu großer Verlust an ätherischem Öl stattfinden könnte, so zieht man es in einigen Fällen, wo es sich um Gewinnung besonders wertvoller ätherischer Öle handelt, vor, die Blüten etc. einzusalzen und in möglichst luftdicht schließenden Fässern zu versenden. In neuerer Zeit hat man allerdings die Kulturen solcher Pflanzen mehr und mehr in die Nähe von Fabriken und umgekehrt verlegt; ich erinnere nur an die großen Rosenfelder der Firma Schimmel & Co., Miltitz.

Sind die Pflanzenteile an Ort und Stelle ihrer weiteren Verarbeitung angekommen, so werden sie, besonders in den Fällen, in welchen es sich um Gewinnung des Öles nach den Methoden der Wasserdampfdestillation handelt, einer möglichst weitgehenden Zerkleinerung unterworfen. Wie im vorhergehenden eingehender erörtert wurde, sind die Ölgänge in der Pflanze durch umlagernde Zellen isoliert. Die Zellwände sind aber, damit sie für Wasser nicht durchlässig sind, mit einer Korkschicht versehen, die natürlich auch verhindern würde, daß der Wasserdampf an das ätherische Öl herantreten kann. Die Zerkleinerung des Materials muß daher soweit gehen, daß die Ölkammern zertrümmert werden. Die Apparate, die zu diesem Zweck benutzt werden, sind verschieden, je nachdem es sich um Kräuter, Wurzeln, Stengel oder Samen und Körner usw. handelt. Die ersteren werden mit Stampfmessern oder Schneidemaschinen zerschnitten, die letzteren gewöhnlich durch Quetschwalzen zerkleinert. Zur Bearbeitung von Holzteilen werden Raspelmaschinen verwandt, durch die das Holz in kleine Späne übergeführt wird. Um möglichst quantitative Ausbeuten des oft wertvollen Gewürzöles zu erzielen, werden die Gewürze in Pulverisierungsmaschinen fein gepulvert.

Wie oben bereits angedeutet wurde, wird das ätherische Öl zur bequemeren Beförderung durch den Organismus der Pflanze in eine wasserlösliche Form, z. B. in Form eines Glykosids, übergeführt. Es gelingt nicht ohne weiteres durch Destillation etc. aus dieser Doppelverbindung die Bestandteile isoliert zu erhalten, wodurch erst eine weitere Zubereitung des Rohmaterials nötig wird. Da die in Frage stehenden Doppelverbindungen leicht durch Fermente gespalten werden, genügt es gewöhnlich, die zerkleinerten Pflanzenteile nach Zugabe des betreffenden Fermentes und Übergießen mit Wasser mehrere Stunden oder Tage bei etwas erhöhter Temperatur stehen zu lassen, worauf man die Destillation der Mischung vornehmen kann. — In einigen Fällen ist es vorteilhaft, dem Rohmaterial erst fremde Bestandteile, wie z. B. fette Öle, zu entziehen, bevor man zur Gewinnung des ätherischen Öls schreitet.

Wenngleich in den Großbetrieben jede einzelne Art von ätherischem Öl in besonderen Maschinen und nach genau ausprobierten Methoden gewonnen wird, so kann man doch im allgemeinen einige wenige allgemeine Methoden der Gewinnung unterscheiden, von denen sich die in der Technik gebräuchlichen in mehr oder weniger weiter Abänderung ableiten. Im folgenden sollen die einzelnen Verfahren in theoretischer Weise betrachtet werden, ohne daß natürlich auf die Spezialmethoden, die sich für das eine oder andere Öl als zweckmäßig erwiesen haben, eingegangen werden kann.

Gewinnung der ätherischen Öle durch Destillation.

a) Wasserdampfdestillation ohne fortdauernde Zuführung von Wasserdampf.

Das einfachste Verfahren, das man zur Gewinnung der ätherischen Öle aus einer Pflanze angewendet hat, besteht darin, die Pflanzenteile mit einem Überschusse von Wasser zu übergießen und die gut durchgerührte Masse der Destillation zu unterwerfen. Die Bestandteile der ätherischen Öle sieden zum weitaus größten Teile unter gewöhnlichem Luftdruck in dem Temperaturintervall von 150 bis ca. 300°, also bedeutend über dem Siedepunkt des Wassers. Das Sieden einer Flüssigkeit tritt in dem Augenblick ein, in welchem der Luftdruck von derselben überwunden wird. Bei Gemischen nehmen an der Überwindung des Luftdrucks sämtliche in dem Gemisch befindliche Flüssigkeiten teil, d. h. wenn die Spannkraft des gesättigten Dampfes sämtlicher Flüssigkeiten gleich dem vorhandenen Luftdruck ist, beginnt das Gemisch zu sieden. Als unmittelbare Folgerung ergibt sich daraus, daß jeder Komponent nur einen Teil des Luftdrucks zu überwinden hat, wodurch ganz ähnliche Verhältnisse herbeigeführt werden wie bei der Destillation im luftverdünnten Raum. Bei der Destillation des Gemisches zweier oder mehrerer Flüssigkeiten tritt das Sieden der Komponenten unterhalb ihres eigentlichen Siedepunktes ein. Durch diese Gesetzmäßigkeit ist es möglich, die weit über 100° siedenden Bestandteile der ätherischen Öle mit Wasserdämpfen überzudestillieren.

In primitiv eingerichteten Fabriken, wie man sie in außereuropäischen Ländern an den Orten der Pflanzenkulturen noch finden kann, werden die Pflanzenteile in eine Retorte gebracht und mit Wasser übergossen, worauf das Gemisch durch direktes Feuer zum Kochen gebracht wird. Es besteht dabei natürlich die große Gefahr, daß durch das Feuer die am Boden der Retorte liegenden Pflanzenteile angebrannt werden, wodurch das gesamte ätherische Öl durch Annehmen eines brenzlichen Geruches verdorben werden kann. Dieser Gefahr ließ sich insofern vorbeugen, als man in die Retorte einen durchlöcherten Siebboden hineingebracht hat, auf dem die Pflanzenteile ausgebreitet werden. In vollkommener eingerichteten Fabriken wird die Erwärmung nicht mehr durch direktes Feuer, sondern durch Wasserdampf bewerkstelligt.

Ist das durch Feuer oder Wasserdampf erhitzte Gemisch der Pflanzenteile mit Wasser zum Sieden gekommen, so wird das durch Verarbeiten des Rohmaterials freigelegte ätherische Öl mit den Wasserdämpfen überdestilliert. Diese Destillation erfordert stets eine längere Zeit, erstens ist sie abhängig von dem Siedepunkt des ätherischen Öles, ferner auch von der mehr oder weniger vollkommenen Zerkleinerung des Rohmaterials. Trotz Anwendung gut arbeitender Maschinen ist es nicht immer möglich, das ätherische Öl völlig freizulegen, da die durch eine Korkschicht eingeschlossenen Harzgänge in vielen Fällen außerordentlich klein sind. Erst durch die Einwirkung der hohen Temperatur bei der Destillation tritt allmählich Zerplatzen der Kammern ein, wodurch dem Öl erst die Möglichkeit gegeben ist, mit den Wasserdämpfen überzugehen. Es ist leicht verständlich, daß durch das lange Andauern der Destillation in prozentischer Menge außerordentlich viel Wasser mit überdestilliert wird, das z. B. eine große Menge Öl gelöst enthalten kann, wenn einige Bestandteile des ätherischen Öles in Wasser löslich sind. Um dem Übelstande abzuhelfen, daß man durch zuviel Wasser große Verluste an Öl erleidet, bedient man sich als Vorlage einer sogenannten Florentiner Flasche, die schon seit den ältesten Zeiten eine wichtige Rolle bei Gewinnung der ätherischen Öle spielt. Durch einen am Boden der Flasche angebrachten Abfluß kann das kondensierte Wasser von dem auf ihm schwimmenden Öle abgelassen und durch Verbindung mit der Retorte dauernd in diese zurückgebracht werden, so daß die einmal angewandte Wassermenge für die oft stundenlang dauernde Destillation ausreicht. Ist das ätherische Öl schwerer als Wasser, so muß sich der Abfluß natürlich nicht am Boden der Florentiner Flasche, sondern am Halse derselben befinden. Die Verbindung zwischen Destillationsretorte und Vorlage wird durch eine längere Röhre hergestellt, damit sich die Dämpfe möglichst schnell und vollständig in ihr verdichten. Da die Kühlung durch die Luft nicht ausreicht, wird das Rohr gewöhnlich durch fließendes kaltes Wasser, dessen Strom dem Dampfstrom entgegengesetzt zu fließen hat, abgekühlt.

Durch das lange Zeit dauernde Einwirken des heißen Wassers auf die Pflanzenteile wird bei empfindlichen Verbindungen leicht eine Zer-

setzung herbeigeführt. Um diese zu vermeiden, sind Apparate konstruiert worden, welche die Destillation der ätherischen Öle mit Wasser im Vakuum auszuführen gestatten. Erst allmählich wurden die großen Schwierigkeiten bei der Konstruktion solcher Apparate überwunden, bis schließlich eine derartige Vollkommenheit in diesen Destilliergefäßen erreicht wurde, daß man jetzt in modern eingerichteten Fabriken besonders empfindliche Parfüms in großen Vakuumdestillationsapparaten gewinnt. Die niedrige Temperatur, welche dann zur Destillation des Wasser- und Ölgemisches erforderlich ist, verhindert eine Zersetzung der wertvollen Bestandteile.

Über die Verarbeitung des Destillates, das eine Mischung des ätherischen Öls mit Wasser darstellt, vgl. später.

b) Wasserdampfdestillation unter fortdauernder Zuführung von Wasserdampf.

Obwohl die im vorigen Abschnitt beschriebene Methode, bei der die Pflanzenteile mit Wasser übergossen und dann der direkten Erwärmung mit Feuer oder Wasserdampf von außen ausgesetzt werden, den Vorzug der Einfachheit hat, ist sie nicht von der praktischen Bedeutung wie die jetzt zu besprechende Destillation unter fortdauernder Zuführung von Wasserdampf, also die eigentliche Wasserdampfdestillation. Sie hat vor der ersteren Methode den großen Vorteil, daß die Pflanzenteile nicht während der ganzen Dauer der Operation in heißem Wasser liegen und dadurch nicht so leicht der Zersetzung anheimfallen können.

Zur Ausführung der Destillation feuchtet man die vorbereiteten Pflanzenteile mit Wasser an und leitet in die Retorte einen hinreichend starken Wasserdampfstrom, der in einem besonderen Gefäße erzeugt wird. Die durchstreichenden Dämpfe nehmen das ätherische Öl in die Vorlage mit über. Da die Retorte, in der sich die Pflanzenteile befinden, nur mit dem Wasserdampf in Berührung kommt, wird eine Erhöhung der Temperatur über 100° und damit ein Anbrennen von Pflanzenteilen völlig vermieden; ferner besteht auch keine so große Gefahr der Zersetzung, wie bei langer Einwirkung von heißem Wasser, so daß man nach dieser Methode im allgemeinen bessere ätherische Öle erhält. Die zur Ausführung der Wasserdampfdestillation dienenden Apparate sind im allgemeinen den besprochenen analog konstruiert, nur muß die Retorte eine Zuleitung für den Wasserdampf am Boden enthalten. Ferner muß durch Benutzung von Schlangenkühlern für eine gute Kühlvorrichtung Sorge getragen werden.

Wenngleich fast alle Bestandteile ätherischer Öle mit Wasserdämpfen destilliert werden können, sind doch viele unter ihnen, die eine außerordentlich lange Destillation erforderlich machen würden, wenn man sie mit gewöhnlichem Wasserdampf überzutreiben versuchte. Es gehören zu diesen Verbindungen hauptsächlich Vertreter der Sesquiterpene bzw. der sich von diesen ableitenden sauerstoffhaltigen Verbindungen, der Sesquiterpenalkohole, von denen einige, wie z. B. die Santalole, eine außerordentlich große technische Bedeutung besitzen. Ist keine Zersetzung dieser Produkte zu

befürchten, so wendet man zu ihrer Destillation gespannten Wasserdampf an. Durch die Erhöhung der Temperatur, die hierdurch veranlaßt wird, gehen die Öle bedeutend schneller über und eine durch die erhöhte Temperatur wirklich eintretende geringe Zersetzung ist in einigen Fällen weniger bedeutend, als wenn man die Destillation mit gewöhnlichem Wasserdampf auf viel längere Zeit ausdehnen müßte. Zur Kondensation der Dämpfe sind in diesem Falle ganz besonders gute Kühlvorrichtungen nötig.

Isolierung der ätherischen Öle aus ihrem Gemisch mit Wasser, wie man es bei den verschiedenen Arten der beschriebenen Destillationen erhält, richtet sich nach den physikalischen Daten des Öles. Dieses kann entweder in Wasser völlig unlöslich sein; es wird sich dann je nach seinem spezifischen Gewicht auf der Oberfläche des Destillationswassers abgeschieden haben oder es wird zu Boden gesunken sein und kann dann in jedem Falle durch Abhebern von der wässerigen Schicht getrennt werden. In einigen, verhältnismäßig jedoch wenigen Fällen, scheiden sich Bestandteile der ätherischen Öle in fester Form ab, so daß man die Kristalle durch einfache Auslese oder Absaugen gewinnen kann. Die völlige Unlöslichkeit des gesamten ätherischen Öles einer Pflanze ist aber ein nur verhältnismäßig seltener Fall. Viel häufiger sind wohl einige Anteile unlöslich, neben ihnen kommen aber auch in Wasser gelöste Verbindungen vor, deren Isolierung dann schon größere Arbeit erfordert. Man vermeidet in diesen Fällen, wie oben schon angedeutet wurde, möglichst eine übermäßig große Anwendung von Wasser, was man durch Verwendung der oben erwähnten Florentiner Flasche als Vorlage erreicht. Um das gelöste Öl vom Wasser zu trennen, unterwirft man die Lösung einer mehrfachen fraktionierten Destillation, wobei man das Öl noch durch Auflösen eines anorganischen Salzes in dem Wasser zur Ausscheidung bringt. Eine genügend oft wiederholte Destillation, eine sog. Rektifikation, liefert ziemlich wasserfreies ätherisches Öl. Nach einer anderen Methode kann das Wasseröl nach Zusatz von Soda etc. ausgeäthert werden oder aber man schüttelt das Wasser mit ca. $^1/_8$ seines Volumens an reinem Olivenöl, wobei das im Wasser gelöste ätherische Öl, besonders nach Zusatz von anorganischen Salzen, in ersteres übergeht, aus dem man es durch Ausschütteln mit Alkohol, der später abdestilliert wird, gewinnt. Aber auch trotz häufiger Rektifikation usw. blieben noch mehrfach sehr leicht in Wasser lösliche Bestandteile der ätherischen Öle im Destillationswasser gelöst, auf die man erst in verhältnismäßig neuer Zeit aufmerksam wurde.

Über die Trennung der Bestandteile der auf erwähnte Art gewonnenen ätherischen Öle kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden, zumal die Methoden für jeden einzelnen Fall andere sein werden. Es soll hier nur kurz erwähnt werden, daß man die Säuren durch Ausschütteln mit Soda, Phenole durch Behandeln mit Alkalilaugen entfernt. Kohlenwasserstoffe trennt man von analog zusammengesetzten Alkoholen und Estern durch fraktionierte Destillation, wobei die ersteren bei bedeutend niedrigerer

Temperatur übergehen werden. Eine völlige Reinigung der Kohlenwasserstoffe von genannten Verbindungen wird sich durch Destillation über Na bewirken lassen. Ist gleichzeitig ein ähnlich siedendes Oxyd dem Kohlenwasserstoff beigemengt, wie es in der Natur nicht selten der Fall ist, so ist eine Trennung der beiden schon bedeutend schwieriger und manchmal nicht völlig durchführbar. Daraus erklären sich dann die verschiedenen Werte, die für eine und dieselbe Verbindung angegeben werden, wenn sie aus verschiedenen Ölen gewonnen wurde.

Es soll an dieser Stelle noch kurz darauf hingewiesen werden, daß bei Gewinnung der ätherischen Öle nach den angegebenen Methoden, bei denen stets höhere Temperatur angewandt wurde, das Material, aus dem die Destillationsgefäße gefertigt sind, eine gewisse Rolle spielt. Besonders werden Metallgefäße auf schwefelhaltige ätherische Öle einwirken und zu Zersetzungen des Öles führen. Doch dürften derartige Schwierigkeiten durch Herstellung geeigneter Gefäßbekleidungen in der modernen Technik zum größten Teil behoben sein.

Gewinnung der ätherischen Öle durch Pressung.

So sorgfältig man auch durch Anwendung geeigneter Modifikationen der angeführten Methoden zur Gewinnung ätherischer Öle durch Wasserdampfdestillation eine Zersetzung des Öles durch erhöhte Temperatur usw. zu verhindern sucht, ist schon in vielen Fällen, besonders wenn es sich um angenehm riechende Öle handelt, die Temperatur des siedenden Wassers eine zu hohe, sogar wenn unter vermindertem Luftdruck gearbeitet wird. In solchen Fällen wird man zu Methoden greifen müssen, die eine Veränderung des Öles ausschließen, und dazu gehört in erster Linie die Gewinnung durch Pressung. Diese Methode läßt sich im allgemeinen, wenn man nicht mit allzu großen Verlusten arbeiten will, nur für sehr weiche, d. h. saft- und ölreiche Pflanzenteile, wozu in erster Linie die Früchte gehören, anwenden. Während diese Art der Gewinnung in früherer Zeit eine größere Ausdehnung hatte, wendet man sie gegenwärtig nur noch hauptsächlich bei Zitronen, Orangen, Pomeranzen und Bergamotten an. Diese weichen Früchte werden zur Freilegung des Öles aus den Ölgängen über mit spitzen Nadeln ausgekleidete Reibeisen bewegt und dann wird mit Hand- oder hydraulischen Pressen das ätherische Öl herausgepreßt. Zum Zwecke der möglichst vollkommenen Pressung werden die Früchte nach Zerreißen der Ölgänge oder, wenn solches wegen der Weichheit des Materiales nicht erforderlich ist, ohne vorherige Zubereitung in druckfeste Beutel gebracht und dann der Pressung in den Maschinen unterworfen.

Wie oben schon hervorgehoben, ist das auf solche Weise gewonnene ätherische Öl, da es nicht höherer Temperatur ausgesetzt war, ziemlich rein und entspricht in seinem Geruche völlig demjenigen, den die Früchte selbst besessen hatten. Von dem gleichzeitig ausgepreßten wässerigen Saft

und schleimigen Bestandteilen wird es durch mechanische Methoden, wie Dekantieren und Filtrieren, in oft nicht schwieriger Weise getrennt.

Gewinnung der ätherischen Öle durch Extraktion mit flüchtigen Lösungsmitteln.

Will man sich im Laboratorium schnell über die Menge usw. des in einem Pflanzenteil vorhandenen ätherischen Öles orientieren, so wendet man in den meisten Fällen die Extraktion mit einem flüchtigen Lösungsmittel an. Man übergießt zu diesem Zwecke das durch Zerkleinerung gut vorbereitete Pflanzenmaterial mit dem betreffenden Lösungsmittel, schüttelt mehrere Male gut durch und läßt das Gemisch noch ca. 1 Stunde zur völligen Lösung des ätherischen Öles bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Auch in der Technik bedient man sich dieses Verfahrens zur Gewinnung von ätherischen Ölen, die in Pflanzenteilen vorkommen, welche nicht gleichzeitig größere Mengen von Harzen oder fetten Ölen enthalten.

Als Lösungsmittel werden hauptsächlich Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Petroläther, Aceton und einige wenige andere verwandt. Das an das Lösungsmittel gestellte Erfordernis ist, daß es alle Bestandteile des ätherischen Öles der Pflanze löst, ferner aber auch viel niedriger wie diese siedet, damit eine Trennung des gewonnenen ätherischen Öles von dem Extraktionsmittel durch fraktionierte Destillation, am besten im Vakuum, ermöglicht ist. Zur Ausführung der Extraktion im Fabrikbetriebe übergießt man das zerkleinerte Pflanzenmaterial mit dem gewählten Lösungsmittel und füllt nach einiger Zeit die entstandene Lösung in eine Destillierblase, um das Lösungsmittel durch Zuführung von Wärme zu verflüchtigen. Das zurückbleibende Öl ist aber durchaus nicht rein, sondern enthält noch Anteile von Lösungsmitteln, die stets hartnäckig von dem Öl zurückgehalten werden. Außerdem sind aber auch fast immer noch mehr oder weniger große Mengen von fremden Bestandteilen von dem Extraktionsmittel aus den Pflanzenteilen aufgenommen worden, die natürlich auch nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels zurückbleiben und das ätherische Öl in unangenehmer Weise verunreinigen können. Es wird sich gewöhnlich um fette Öle oder Harze handeln. Eine Trennung von diesen Verunreinigungen kann durch fraktionierte Destillation, eventell im Vakuum oder durch Wasserdampfdestillation erfolgen, die jetzt nicht mehr so gefährlich ist, da keine Pflanzenteile mehr vorhanden sind; in einigen Fällen hat sich auch zur Entfernung der letzten Anteile des Lösungsmittels das Hindurchleiten eines Kohlensäurestromes durch die qu. Mischung als erfolgreich erwiesen.

Der große Vorteil des Extraktionsverfahrens ist, daß man trotz Arbeitens bei gewöhnlicher Temperatur eine verhältnismäßig quantitative Ausbeute an ätherischem Öl gewinnt. Der große Nachteil der Methode besteht in der erwähnten schwierigen Isolierung des ätherischen Öles von den gleichzeitig durch das Lösungsmittel aufgenommenen fetten Ölen, Harzen usw. Es wird also nur da Anwendung finden, wo eine Wasser-

dampfdestillation keine guten Produkte geliefert hat, hauptsächlich also bei angenehm riechenden Blütenölen. Arbeitet man mit sehr niedrig siedenden Lösungsmitteln, wie z. B. Äther, der schon bei 35° siedet, so kann man in einigen Fällen bei der Siedetemperatur des Lösungsmittels extrahieren, was natürlich für eine quantitative Ausbeutung der Pflanzenteile sehr nützlich ist.

Als besondere Modifikationen der eben beschriebenen Gewinnung der ätherischen Öle mittelst eines flüchtigen Lösungsmittels sollen noch die Extraktion unter erhöhtem und diejenige unter vermindertem Druck erwähnt werden. Bei dem ersteren Verfahren wird durch Erhöhung des Druckes eine leichtere Zerplatzung der Ölkammern im Innern der Pflanzenteile bewirkt und damit eine bessere Ausbeute erzielt. Beim Arbeiten nach dem Verfahren unter vermindertem Druck soll die Güte des gewonnenen Parfüms eine bessere sein. Die Ausführung beider Methoden erfordert ziemlich komplizierte und dadurch teure Apparate. Ihre Anwendung beschränkt sich hauptsächlich auf Blütenöle.

Gewinnung der ätherischen Öle durch Extraktion mit nichtflüchtigen Lösungsmitteln.

Die Verfahren der Gewinnung ätherischer Öle durch Extraktion mit nichtflüchtigen Lösungsmitteln sind ebenso wie die entsprechenden mit flüchtigen Lösungsmitteln auf verhältnismäßig wenige Spezialfälle beschränkt. Fette oder mineralische Öle wie Paraffin besitzen die Fähigkeit, ätherische Öle, die besonders leicht flüchtig sind — es handelt sich auch hier um Blütenöle, so z. B. Reseda, Rose etc. —, wenn sie in nahe Berührung mit ihnen gebracht werden, aufzunehmen. Man breitet das Fett zweckmäßig in großen Flächen aus und legt die zerpflückten Blüten der betreffenden Pflanzen auf dasselbe; dieses Verfahren wird unter Anwendung desselben Fettes mehrere Male wiederholt, bis sich das Lösungsmittel völlig mit dem flüchtigen Öl beladen hat. Die so erhaltene Auflösung von ätherischem Öl in dem Fett wird entweder als Pomade in den Handel gebracht oder aber das ätherische Öl durch Extrahieren mit Alkohol usw. isoliert und gereinigt. Es ist leicht ersichtlich, daß dieses Verfahren kein quantitatives ist, da aber von dem Fett nur die verdunstenden Bestandteile des ätherischen Öles aufgenommen werden, die ja gerade den angenehmen Blütengeruch tragen, ist das erhaltene ätherische Öl sehr wertvoll.

Neben der soeben beschriebenen Methode, bei der man völlig in der Kälte ohne Anwendung höherer Temperaturen arbeitet, ist noch ein analoges Extraktionsverfahren im Gebrauch, das bei 60—70° ausgeführt wird. Es hat sich durch Versuche gezeigt, daß einige Blütenöle nicht an Güte ihres Geruches verlieren, wenn man das Fett auf 60—70° erwärmt, daß aber bei dieser Modifikation der Methode eine bessere Ausbeute erzielt wird. Man erwärmt das Fett auf die angegebene Temperatur und läßt dasselbe einige Zeit auf die hinzugegebenen Blüten einwirken. Die festen Teile werden

nachher mechanisch von dem Fett durch Abpressen getrennt. Auch hier bringt man das mit dem ätherischen Öl beladene Fett entweder direkt als Pomade in den Handel oder aber man gewinnt das erstere durch Extrahieren mit Alkohol, in dem die fetten Öle unlöslich sind, oder durch Übertreiben mit Wasserdämpfen, wobei das ätherische Öl mit diesen übergeht, während das fette Öl zurückbleibt.

Anhangsweise soll unter diesem Abschnitt noch die Gewinnung der ätherischen Öle nach der pneumatischen Methode erwähnt werden, da sie im Prinzip dem ersteren der hier besprochenen Extraktionsverfahren sehr nahe kommt. Man leitet über ausgebreitete Pflanzenteile einen Luft- oder Kohlensäurestrom, der das leicht verdunstende ätherische Öl aufnimmt. Diesen Gasstrom führt man dann durch eine Waschflasche mit einem Lösungsmittel, welches dem Gasstrom das ätherische Öl entzieht, während es das Gas selbst ungehindert durchstreichen läßt. Als Lösungsmittel wird gewöhnlich ein leichtflüchtiges gewählt, das man durch oben eingehend besprochene Methoden von dem ätherischen Öl abdestillieren kann. Es ist leicht ersichtlich, daß man auch bei dieser Methode auf eine quantitative Ausbeute nicht rechnen kann; auch sie findet nur in seltenen Fällen Anwendung, bei denen sie sich zur Gewinnung eines angenehm riechenden und deshalb teuren Parfüms als besonders geeignet erwiesen hat.

Darstellung und Nachweis der Gerbstoffe.[1]

Von **M. Nierenstein**, Bristol.

Für die Gewinnung von Gerbstoffen kommen folgende Arbeitsmethoden besonders in Betracht:

1. Die Äthermethode von *Pelouze*,

2. die Acetonmethode *Trimbles*,

3. die Extraktion mittelst Wasser oder Alkohol und Fällen der Gerbstoffe mit Bleiacetat oder Extraktion des wässerigen Auszuges mit Essigäther und Fällen der Gerbstoffe mit Äther *(Körner)* oder Petroläther *(Franke)*,

4. die Wiedergewinnung der Gerbstoffe aus den Acetylderivaten nach *Hlasiwetz*.

Wir werden die oben erwähnten Arbeitsmethoden getrennt besprechen, doch möchten wir gleich hier vorausschicken, daß sich in letzter Zeit die

---

[1]) Literatur (Darstellung). *H. Trimble*, The Tannins. 2 Vol. (Philadelphia 1892 und 1894). — *Griebel*, Über den Kaffeegerbstoff. Inaug.-Diss. (München 1903). — *A. Mozeau de Tours*, Le Maté (Paris 1903). — *Vournassos*, Le Tannin de la noix de galle, sa constitution (Paris 1903). — *Reuchlin*, Über Maté-Gerbstoff. Inaug.-Diss. (München 1904). — *Geschwender*, Beiträge zur Gerbstofffrage. Inaug.-Diss. (Erlangen 1906). — *Gorter*, Beiträge zur Kenntnis des Kaffees. Annal. d. Chem. Bd. **358**. S. 327 (1908) und Bd. **359**. S. 217 (1908). — *H. R. Procter*, Leather Industries Laboratory Book. 2. Edit. (London 1908). — *J. Dekker*, De Looistoffen, botanisch-chemische Monographie der Tanniden. Bd. 2 (Amsterdam 1908). — *J. Dekker*, Le tannin de l'écorce d'Eucalyptus occidentalis. Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles. Série II. T. **14**. p. 50 (1909).

(Nachweis). *Andreasch*, Qualitative Untersuchung verschiedener Gerbstoffe. Der Gerber (1894). — *H. R. Procter*, Leather Industries Laboratory Book. 2. Edit. (London 1908). — *Trotman*, Leather Trades Chemistry (London 1908). — *Parker* und *Payne*, A new methode for the analysis of tannin and tanning materials and the identification of admixtures in tanning extracts and liquors. Journ. of the Soc. of Chem. Industry. Vol. **24**. p. 650 (1904). — *Barker* und *Russel*, The composition of Cidre. The Analyst. Vol. **34**. p. 125 (1909).

*Hlasiwetz*sche[1]) Methode weder in den Händen *Körners*[2]) noch in denjenigen des Verfassers bewährt hat, und daß wir daher auf diese nicht näher eingehen werden.

Die Äthermethode von *Pelouze*[3]) beruht auf der Annahme, daß der Wasser und Alkohol enthaltende Äther das Tannin wie auch andere Gerbstoffe löst. Für die Extraktion am Rückflußkühler verwendet man eine Mischung, die 30 T. Äther, 5 T. Wasser und 2 T. Alkohol enthält, wobei sich dann drei Schichten beim Stehen bilden lassen, von denen die untere den höchsten Gerbstoffgehalt hat (vgl. *Mohr*[4]), *Lubolt*[5]) und auch *Procter*[6]); letzterer findet in der oberen Schichte 2·2%, in der mittleren 3% und in der unteren 33% Tannin bei der Extraktion von Gallen. Diese Beobachtungen *Procters* sind vor kurzem auch von *Dekker*[7]) bestätigt worden. Bei zweitägiger Extraktion mit obigem Gemisch soll man 1 *g* Tannin aus 35—40 *g* Sumach, 13—15 *g* Divi-Divi, 16—18 *g* Myrabolanen und 10—12 *g* Galläpfeln erhalten. Im Handel kommt das Tannin, das nach obigem Verfahren bereitet wird, in drei verschiedenen Sorten vor, und zwar als: *a)* Äther-Tannin (Schaum-Tannin), *b)* Alkohol-Tannin und *c)* Wasser-Tannin und sind diese die verschiedenen Fraktionen resp. Schichten der Darstellung. *Nierenstein* empfiehlt, das Tannin durch Lösen und Fällen mit Kochsalz zu reinigen, und da er für seine Arbeiten acetyliertes Tannin verwendet, so kommt der Salzgehalt des so erhaltenen Produktes weniger in Betracht. Er empfiehlt auch, das Tannin mit Äther zu extrahieren, um es so von Gallussäure zu befreien. Ein gallussäurefreies Tannin darf mit cyansaurem Kalium keine Rotfärbung geben. *Dekker* und auch *Nierenstein* sprechen sich zugunsten des sog. Tanninum levissimum pur. Schering aus und soll dieses, wie *Nierenstein*[8]) findet, zuckerfrei sein.

Trimble[9]) verwendet für seine umfangreichen Arbeiten über Eichengerbstoffe und andere Gerbstoffe hauptsächlich Aceton als Extraktionsmittel. Die fein vermahlene Rinde wird mit der 10—20fachen Menge übergossen und 48 Stunden stehen gelassen. Der erste Teil an Aceton wird schnell abfiltriert und dann mit einer zweiten Menge des Lösungsmittels

---

[1]) *Hlasiwetz*, Die Beziehungen zwischen Gerbsäuren, Glukosiden, Phlobaphenen und Harzen. Wiener akad. Ber. Bd. **55**. (Abt. 2.). S. 7 (1867).

[2]) *Körner*, Studien auf dem Gebiete vegetabilischer Gerbstoffe. Gerberzeitung. Bd. **47**. S. 115 (1904).

[3]) *Pelouze*, Mémoire sur le tannin et les acides galliques, pyrogalliques, ellagiques et métalliques. Ann. de Chim. et Phys. T. **54**. p. 337 (1834).

[4]) *Mohr*, Über ätherische Gerbsäurelösungen. Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **61**. S. 352 (1849).

[5]) *Lubolt*, Über das Verhalten der Gerbsäure gegen Äther und Wasser. Journ. f. prakt. Chem. Bd. **77**. S. 357 (1859).

[6]) *B. Procter*, Tannin, its solubilities. The Pharm. Journ. Vol. **6**. p. 351 (1889).

[7]) *J. Dekker*, De Looistoffen. Bd. **2**. S. 9 (Amsterdam 1908).

[8]) *Nierenstein*, Über das Drehungsvermögen des Tannins. Chem.-Zeitg. Bd. **33**. S. 126 (1909).

[9]) *Trimble*, The Tannins. Vol. **2**. p. 18 (Philadelphia 1894).

ausgezogen — man arbeitet so, daß man pro Kilogramm Rinde 500 *cm*³ Aceton verwendet —, die Rinde wird dann mit wenig Wasser nachgespült und die drei Abzüge bis zur Hälfte eingeengt und im Vakuum bis zur Trockene abdestilliert. Das so erhaltene Produkt wird dann entweder in wenig Wasser oder, was *Trimble* besonders empfiehlt, in Alkohol (spez. Gew. 0·975) gelöst, die Phlobaphene und Farbstoffe mit Wasser ausgefällt und das Filtrat mit Essigäther extrahiert. Der Essigäther wird im Vakuum destilliert und dieses Reinigungsverfahren 3—4mal wiederholt. Die Gerbstoffe werden im Vakuum getrocknet. (Ton gibt Schmieren [*Nierenstein*].) Die nach dem *Trimble*schen Verfahren dargestellten Pyrokatecholgerbstoffe fallen gewöhnlich rotgefärbt aus. *Strauss* und *Geschwender*[1]) sollen Alkohol statt Aceton mit besserem Erfolg angewandt haben.

Zur Gewinnung des Gerbstoffes wird nach *Strauss* und *Geschwender* mit Chloroform im *Bitter*schen Apparat extrahiert (dies soll bei Blättern: Tee, Sumach usw. unerläßlich sein) und dann mit Alkohol ausgezogen.

Andrerseits wird Wasser zur Extraktion verwendet und haben nach dieser Methode *Hlasiwetz, Böttinger* u. a. m. gearbeitet. Man extrahiert entweder heiß oder kalt, schüttelt mit Äther öfters aus und fällt mit Bleiacetat. Das Bleisalz wird dann entweder mit verdünnter Schwefelsäure oder Schwefelwasserstoff zersetzt und der Gerbstoff mit Essigäther ausgezogen. Des weiteren verfährt man wie oben. *Procter*[2]) und auch *Nierenstein* haben beim Arbeiten mit Schwefelwasserstoff gefunden, daß dieser Tannin in Gallussäure spalte und sprechen sich daher gegen die Verwendung von H_2S aus. Was die Zersetzung mit verdünnter Schwefelsäure anbetrifft, so empfiehlt *Nierenstein*[3]) eine teilweise Zersetzung des Bleisalzes, und verwendet er nur die ersten beiden Auszüge. Er nimmt an, daß sich das Gerbstoffbleisalz vor dem Farbstoffbleisalz zersetze. Ähnliches hat auch *A. G. Perkin*[4]) beobachtet. Außerdem soll man nach *Nierenstein*[5]) das Bleiacetat in kleinen Portionen hinzufügen und die Bleisalzbildung unterbrechen, wenn sich das erste gefärbte Salz ausscheidet. Gute Resultate wollen *Körner*[6]) und Mitarbeiter (*Petermann, Düllberg, Nierenstein* und *Franke*) erzielt haben, wenn sie den Gerbstoff kalt mit Wasser extrahierten, ihn dann mit Essigäther auszogen und mit Äther, Petroläther oder Chloroform fällten. Sie erhielten so fast farblose Gerbstoffe, was ihnen besonders beim Quebrachogerbstoff gelang, der gewöhnlich nach der Aceton-

---

[1]) *Strauss* und *Geschwender*, Beiträge zur Kenntnis einiger Gerbstoffe. Zeitschr. f. angew. Chemie. Bd. **19**. S. 1121 (1906).

[2]) *H. R. Procter*, Leather Industries Laboratory Book. 2. Edit. S. 111 (1908).

[3]) *Nierenstein*, Zur näheren Kenntnis einiger „Blume" gebender Gerbstoffe. Collegium. S. 21 (1905).

[4]) *A. G. Perkin*, The yellow colouring principles of various tannin materials. Journ. Chem. Soc. Vol. 69. p. 1131 (1897).

[5]) *Nierenstein*, l. c.

[6]) *Körner*, l. c.

methode tiefrot erhalten wird. Die so gewonnenen Gerbstoffe fallen zuerst harzig aus, doch erhält man sie nach wiederholtem Lösen in Essigäther und Fällen mit Äther als amorphes Pulver.

Beim Arbeiten mit Gerbstoffen macht man die unangenehme Erfahrung, daß diese wegen ihrer großen Unbeständigkeit schwer zu hantieren sind, und muß man sich manchmal nur mit ihrer Identifizierung begnügen. Bekanntlich lassen sich die Gerbstoffe in zwei Hauptgruppen, und zwar in Pyrogallol- und Pyrokatecholgerbstoffe teilen. Die ersteren bilden die sog. „Blume", die aus Ellagsäure besteht, während die letzteren die „Phlobaphene" oder „Gerberrot" liefern. Handelt es sich darum, einen Gerbstoff zu identifizieren, so hält man sich am besten an folgende Reaktionen:

	Pyrogallolgerbstoff	Pyrokatecholgerbstoff
Eisenchlorid	blau	grün
Bromwasser	k. Nd.	Nd.
Kalischmelze	Gallussäure oder Pyrogallol	Protokatechusäure und Phloroglucin

Leider versagt auch diese Klassifikation, da man es oft mit Gemischen zu tun hat. *Procter* [1]) gibt eine Reihe von Farbenreaktionen an. Es sei hier auf das Original verwiesen. *Nierenstein* [2]) verwendet Diazobenzolchlorid; es sollen nur die Pyrokatecholgerbstoffe unlösliche Diazoprodukte liefern.

Außer den oben angeführten Untersuchungsmethoden kann man die Gerbstoffe in Glyzerinlösung erhitzen, wobei sich die verschiedenen Phenole bilden, oder man behandelt sie am Rückflußkühler mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure (2% HCl) und erhält so Gallussäure, Ellagsäure, Protokatechusäure, andere aromatische wie aliphatische Säuren und Zucker. *Procter* [3]) empfiehlt für das Erhitzen des Gerbstoffes in Glyzerin folgende Methode: 1 *g* Gerbstoff wird mit 5 cm^3 Glyzerin auf 160° erhitzt und die Temperatur dann auf 200—210° für 30 Minuten langsam gesteigert. Nach dem Erkalten wird mit 20 cm^3 Wasser versetzt und mit Äther extrahiert.

Trimble [4]) extrahiert, ohne mit Wasser zuerst zu verdünnen. Für die Verseifung mit Säuren verfährt man so, daß man den wässerigen Gerbstoffauszug mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure am Rückflußkühler kocht und dann für einige Tage stehen läßt. Es scheiden sich hierbei Ellagsäure und Phlobaphene ab. Als zuverlässigen Nachweis für Ellagsäure kann man die Salpetersäurereaktion nach *Griessmeyer* verwenden, man erhält, wenn man das trockene Produkt mit Salpetersäure (1—2 Tropfen) und dann mit Wasser (10—20 Tropfen) versetzt, ein schönes Himbeerrot.

[1]) *H. R. Procter,* l. c. S. 146—167.

[2]) *Nierenstein,* Zur qualitativen Analyse der Gerbstoffe. Collegium. S. 376 (1906).

[3]) *H. R. Procter,* l. c. S. 112.

[4]) *Trimble,* The Tannins. Vol. 1. p. 27 (Philadelphia 1892).

Nach dem Entfernen des Unlöslichen (Ellagsäure usw.) extrahiert man mit Äther und prüft auf verschiedene aromatische und aliphatische Säuren. Die Lösung wird dann mit Bleiacetat versetzt, der Überschuß an Bleiacetat mit verdünnter Schwefelsäure entfernt und auf Zucker geprüft. *Nierenstein* [1]) arbeitete beim Tannin so, daß er die Tanninlösung mit Casein entgerbte und dann auf Zucker untersuchte.

Bei der Untersuchung von Phlobaphenen, die nach *Nierenstein* [2]) dem Anthrachinon angehören sollen (das Quebrachogerbsäure-Phlobaphen wurde von ihm Ruffiquebrachosäure genannt), handelt es sich oft um Alkalischmelzen. Allem Anscheine nach erhält man unter folgenden Arbeitsbedingungen die besten Resultate: 20 *g* Phlobaphen werden mit 100 *cm*³ Kalilauge (spez. Gew. 1·20) 3 Stunden gekocht und die Lösung dann unter lebhaftem Umrühren eingeengt. Man verfährt dann wie bei der Kalischmelze.

Versucht man die Gerbstoffe zu kristallisieren, so findet man dies, soweit unsere gegenwärtigen Kenntnisse reichen, als ein aussichtsloses Unternehmen. Das einzige kristallisierende Derivat des Tannins hat *Vournassos* [3]) beschrieben; es soll das das Pentabenzoyltannin sein. Wie weit man dieser Mitteilung Wert beilegen kann, werden weitere Erfahrungen lehren müssen. *A. G. Perkin* und *Nierenstein* verwandten mit gutem Erfolg Pyridin für die Kristallisation von Ellagsäure. Es gelang letzterem, mittelst Pyridin aus den Myrabolanen Ellagsäure wie auch Luteosäure zu isolieren.

Bei der Auswahl der Reagenzien für die Gerbsäuren in der Pflanzenzelle kommen die verschiedenen Eisensalze, Kaliumbichromat und Kaliumcyanat in Betracht. *Richard Büttner* [4]) hat die Eisensalze besonders sorgfältig studiert. Er empfiehlt: Ferrum citricum ammoniatum, Ferrum citricum oxydatum, nachdem es mit NH_3 soweit abgestumpft ist, daß nur noch schwachsaure Reaktion erkennbar ist, Ferrum sesquichloratum, ebenfalls fast neutral, Ferrum sulfuricum und Ferrum sulfuricum oxydatum in wenig saurer Lösung. Die Konzentrationen für Deckglasuntersuchung sind nach *Büttner:* 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 1500 und 1 : 2000. Auf den eigentlichen Wert der Eisenfärbung wollen wir hier nicht eingehen, wir haben sie öfters und eingehend an anderer Stelle kritisiert.

Für die *Sanio*sche Bichromatmethode [5]) werden die zu untersuchenden Pflanzenteile in eine 5%ige Kaliumbichromatlösung gebracht, worin sie im

---

[1]) *Nierenstein*, Über das Drehungsvermögen des Tannins. Chem.-Zeitg. Bd. 33. S. 126 (1909).

[2]) *Nierenstein*, Beitrag zur Kenntnis der Gerbstoffe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 40. S. 4575 (1907).

[3]) *Vournassos*, Le Tannin de la noix de galle, sa constitution (Paris 1903).

[4]) *Büttner*, Über die Gerbsäurereaktion in der lebenden Zelle. Inaug.-Diss. (Erlangen 1891).

[5]) Botan. Zeitg. S. 17 (1863), zitiert nach *K. Wilke*, Über die anatomischen Beziehungen des Gerbstoffes zu den Sekretbehältern der Pflanze. Inaug.-Diss. (Halle 1883).

allgemeinen 14 Tage verbleiben. Nach Ablauf dieser Zeit sind diese vollständig imprägniert und liefern leicht dünne Schnitte, die vor der Untersuchung für zwei Tage sorgfältig gewaschen werden müssen. Für quantitative Zwecke hat *Kutscher* eine kolorimetrische Skala ausgearbeitet. Diese Skala zeigt 8 Grade, indem mit 1 die schwächste, mit 8 die stärkste Färbung des Niederschlages bezeichnet wird.

Als Gegenreaktion für Gallussäure empfehlen *Drabble* und *Nierenstein*[1]) eine 1%ige Cyankaliumlösung, indem sie Schnitte mit Eisenchlorid und Cyankalium ausfärben und durch das Ausbleiben des Rotes mit Kaliumcyanat auf die Abwesenheit von Tannin resp. Gallussäure schließen. Sie haben an der Hand dieses Reagens die Verwendung von Tannin und anderer Gerbsäuren in dem Verkorkungsprozeß der Zellen studiert.

---

[1]) *Drabble* und *Nierenstein*, On the role of Phenoles, Tannic acids and Oxybenzoic acids in cork-formation. Bio-chemical Journ. Vol. 2. p. 96 (1907).

Die Isolierung von Fäulnisbasen.

Von **D. Ackermann**, Würzburg.

Das Substanzgemenge, welches sich demjenigen darbietet, der nach Fäulnisbasen fahndet, ist, wenn nicht ein einfacher, wohldefinierter chemischer Körper der Wirkung der Fäulnisbakterien ausgesetzt wird, ein außerordentlich mannigfaches. Nimmt man nur den relativ einfachen Fall der Fäulnis eines einzigen Eiweißkörpers, wie z. B. des Leims, so können sich in der zur Untersuchung kommenden Lösung außer nicht völlig abgebautem Eiweiß erstens einmal die sämtlichen Produkte der tryptischen Wirkung der Fäulnisbakterien, also die Aminosäuren finden, zweitens aber sind darin diejenigen Körper, welche der Lebensprozeß der Mikroorganismen aus den Aminosäuren bildet. Kommen nun gar ganze Organe, wie Muskeln, Milz, Pankreas etc., zur Untersuchung, so ist der Fall noch bei weitem komplizierter. Hat man hier doch mit so ziemlich sämtlichen Stoffen zu rechnen, welche überhaupt als Bausteine des Organismus dienen, und ferner wieder noch mit denjenigen Substanzen, die aus den ersteren durch Wirkung der Fäulnisbakterien entstehen. Hatte die Fäulnis lange genug gedauert, so ist die Situation allerdings etwas vereinfacht, weil dann ein Teil der Körper, z. B. die Aminosäuren, größtenteils verschwunden sind. Immerhin bleibt das Substanzgemenge in all diesen Fällen ein äußerst kompliziertes und man wird angesichts dessen von keiner der hier zu schildernden Methoden etwas Vollkommenes erwarten dürfen.

Was die Bezeichnung „Fäulnisbasen" angeht, so müßte dieselbe eigentlich nach dem heutigen Stand unserer Kenntnisse ausschließlich für solche Körper reserviert werden, welche nicht durch einfache hydrolytische Abspaltung entstehen, wie z. B. das Cholin aus Lecithin, sondern nur für diejenigen basischen Substanzen, die bei ihrer Entstehung der Wirkung der Fäulnisbakterien nicht entraten können. Indessen auch eine derartige Grenze läßt sich heutzutage nicht mehr ziehen, seitdem es gelungen ist, typische Fäulnisbasen, wie Pentamethylendiamin und Tetramethylendiamin, aus einigen niederen Pflanzen darzustellen. So wird also die Bezeichnung „Fäulnisbase"[1]) für etwas, was nur dem Fäulnisprozeß eigentümlich ist, sich all-

[1]) Der Name Ptomaine, den man vielfach noch als Synonymum für Fäulnisbase verwendet, wird aus dem gleichen Grunde wohl ebenfalls bald verschwinden.

mählich verlieren, und für uns kann im folgenden auch nur die Aufgabe darin bestehen, zu schildern, mit welchen Methoden man basische Stoffe aus Fäulnisgemischen isoliert.

1. Verfahren nach Brieger.[1])

Die Fäulnismassen werden bei schwach salzsaurer Reaktion eingedampft. Den so erhaltenen dicken Sirupen können die salzsauren Ptomaine durch Alcohol absolutus entzogen werden, da selbst die an und für sich in Alkohol unlöslichen Chloride mancher Basen bei Gegenwart anderer Ptomaine leicht in den Alkohol übergehen. Dieser Alkohol wird abgedampft und jetzt gelingt es häufig schon durch wiederholte Erschöpfung mit absolutem Alkohol, solche Basen, deren Chloride nur schwer in dieses Lösungsmittel eingehen, vor allem das Neuridinchlorid, zur Abscheidung zu bringen. Das Neuridinchlorid wird mit Wasser aufgenommen und durch Überführung in das Pikrat gereinigt.

Die verbleibende alkoholische Lösung wird mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung gefällt und 24 Stunden stehen gelassen. Der Quecksilberniederschlag wird alsdann abgesaugt, mit alkoholischer Quecksilberchloridsolution gewaschen und getrocknet, dann mit viel heißem Wasser gekocht und vom Unlöslichen abfiltriert. Durch diese Manipulation gelingt es, die in den Alkohol übergegangenen Eiweißkörper (Peptone u. dgl.) vollständig zu beseitigen, denn es hat sich erwiesen, daß die Quecksilberchloridverbindungen dieser Eiweißkörper auch in viel kochendem Wasser unlöslich sind, während alle Quecksilberdoppelverbindungen organischer Basen sich in Wasser lösen; äußerst schwer löslich, selbst in heißem Wasser, ist allerdings das Quecksilberdoppelsalz des Cholins, eine Eigenschaft, die man leicht zur völligen Abscheidung des Cholins von den übrigen Basen benutzen kann. Beim Erkaltenlassen des die Quecksilberverbindungen enthaltenden Filtrates kristallisiert nämlich das Cholinquecksilberchlorid alsbald vollständig aus, während die übrigen Basen in Lösung bleiben.

Diese Mutterlauge filtriert man ab, leitet Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung ein und beseitigt das Schwefelquecksilber durch Absaugen. Die so erhaltene Lösung der Chloride dampft man ein, nimmt mehrmals mit 96%igem, nicht mit absolutem Alkohol auf und bringt auf diese Weise Kristalle von Tetramethylendiaminchlorid zur Abscheidung; es ist wichtig, den Alkohol nicht absolut zu nehmen, weil in diesem Falle auch das Pentamethylendiamin sich teilweise mit ausscheidet und somit der Zweck des Verfahrens vereitelt wird. Beim längeren Stehen des alkoholischen Auszuges fallen dann auch die etwa in Lösung gegangenen Reste des Tetramethylendiamins aus und man identifiziert den Körper jetzt am besten durch Überführung in das Chloraurat, indem man die Kristalle des Chlorides mit etwas Wasser aufnimmt und mit wässeriger Goldchloridlösung fällt.

[1]) *Brieger,* Über Ptomaine. Berlin, Hirschwald 1885 und 1886. Drei Monographien.

Das alkoholische Filtrat des Tetramethylendiamins enthält außer einer Reihe anderer Basen in überwiegender Menge Pentamethylendiaminchlorid, das man isoliert, indem man mit alkoholischer Platinchloridlösung fällt. Es ist diese Fällung um so notwendiger, als auch die anderen Basen mit Platinchlorid Verbindungen von allerdings größerer Löslichkeit, als die des Pentamethylendiamins ist, eingehen. Durch Umkristallisieren aus Wasser gelingt es, diese verschiedenen Platinate, wenn auch allerdings ziemlich mühevoll, zu trennen. Die Schwerlöslichkeit des Kadaverinplatinates befähigt dasselbe, zuerst auszukristallisieren. Anfänglich scheidet sich diese Doppelverbindung in ziemlich reinem Zustande aus, je mehr man aber die Lösung einengt, desto mehr ist das Platindoppelsalz des Kadaverins mit dem des Saprins untermengt. Schließlich überwiegt das Platinat des Saprins. Die noch spärlich eingestreuten, durch ihren Glanz und ihre Kristallform deutlich hervorleuchtenden Kadaverinplatinate werden mittelst Lupe von den mehr mattschimmernden Kristalloiden des Saprinplatinates, auf denen sie oft aufsitzen, abgesondert. Durch wiederholtes Umkristallisieren aus Wasser gelingt es dann schließlich, analysenreine Präparate des Platinats des Saprins zu erhalten.

In den nach Entfernung des Saprins restierenden Platinlaugen kann noch die Platinverbindung des Mydaleins zurückbleiben, die, äußerst löslich in Wasser, erst nach starker Einengung auf dem Wasserbade oder längerem Stehen unter dem Exsikkator in Form kleinster Nädelchen auskristallisiert. Die Reinigung dieses Doppelsalzes verursacht große Schwierigkeiten wegen der äußerst leichten Löslichkeit desselben und der Unfähigkeit des Mydaleins, mit anderen Basenfällungsmitteln schwer lösliche Verbindungen zu bilden. Es bleibt dann schließlich nichts weiter übrig, als durch wiederholtes Lösen des Platinates in sehr wenig lauwarmem Wasser ein möglichst reines Präparat zu erzielen; natürlich ist dabei der Materialverlust ein sehr bedeutender.

Die Fällung der vom Alkohol aufgenommenen salzsauren Ptomaine durch alkoholische Quecksilberchloridlösung hat allerdings den größten Teil der Ptomaine eliminiert, doch bleiben in der von dem Quecksilberchloridniederschlage befreiten Lauge noch basische Substanzen zurück. Diese Lauge wird nun unter Wasserzusatz eingedampft und, nachdem der Alkohol verjagt ist, durch Schwefelwasserstoff das Quecksilber entfernt. Beim Eindampfen des vom Schwefelquecksilber befreiten Filtrates wird die überschüssige Salzsäure durch Soda abgestumpft. Der Trockenrückstand, mit absolutem Alkohol erschöpft, läßt nur wenige Körper in denselben übertreten. Dieselben sind je nach der Art des Fäulnismateriales recht verschieden. Bei Fleischfäulnis findet man hier Methylguanidin. Um dies zu isolieren, wird die alkoholische Flüssigkeit vom Alkohol befreit, der Sirup mit etwas Wasser aufgenommen, worauf mit Phosphormolybdänsäure ein Niederschlag hervorgerufen wird. Diesen zerlegt man mit essigsaurem Blei und dampft nach der Entbleiung mit wenig Salzsäure ein. Durch pikrinsaures Natrium schlägt man jetzt daraus ein harziges Pikrat nieder.

das mit Wasser ausgekocht in Gestalt von verfilzten, in Wasser sehr schwer löslichen Nadeln erstarrt. Durch wiederholtes Lösen derselben in kochendem absoluten Alkohol wird schließlich analysenreines Methylguanidinpikrat gewonnen, das man zur besseren Identifizierung noch in das Goldsalz umwandeln kann.

Waren als Ausgangsmaterial für die Untersuchung gefaulte Fische genommen, so kann man in dem vom Quecksilber befreiten Filtrat der Quecksilberfällung Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin und Diäthylamin finden. Man macht nun entweder mit Natronlauge alkalisch, destilliert die Basen in vorgelegte Salzsäure hinein und dampft, wenn keine Basen mehr übergehen, das Destillat ein, um es nun weiter zu untersuchen, oder aber man verwendet, ohne davon abzudestillieren, die Basenflüssigkeit direkt. In beiden Fällen muß man zuerst solange mit absolutem Alkohol aufnehmen, bis sich kein Ammoniumchlorid mehr ausscheidet, dann dampft man den Alkohol ab und wird nun am besten direkt mit starker wässeriger Goldchloridlösung fällen: ist Trimethylamin vorhanden, so scheidet sich sofort das sehr schwer lösliche Chloraurat dieser Base aus. Für die Abscheidung der anderen Körper eignen sich gleichfalls die Salze des Goldes und des Platins am besten und es ist bei Trennungen mit Hilfe derselben zu beachten, daß das Platinat des Methylamins in Alkohol unlöslich, in Wasser schwer löslich, das des Dimethylamins in kaltem Wasser schwer löslich, in Alkohol am leichtesten löslich ist. Demgegenüber ist das Goldsalz des Methylamins in Wasser leicht löslich, das des Dimethylamins ebenfalls ziemlich leicht löslich. Da von *Briegers* Schüler *Bocklisch*[1]), der die Bearbeitung der Fischfäulnisbasen nach *Briegers* Methoden übernommen hatte, niemals die vier genannten flüchtigen Basen gleichzeitig nebeneinander aus ein und demselben Ausgangsmaterial dargestellt wurden, kann auch nicht genauer angegeben werden, wie sich die Trennung der vier Basen voneinander im einzelnen gestalten würde.

Brieger hat nun seine Methode mit verschiedenen Modifikationen verwandt. Erstens einmal benutzt er zur vollständigen Trennung des Pentamethylendiamins vom Tetramethylendiamin nicht nur die verschiedene Löslichkeit ihrer Chloride in Alkohol, sondern auch das differente Verhalten der Quecksilber- und Goldsalze, insofern das Tetramethylendiamin ein ziemlich schwer lösliches Goldsalz und ein leichter lösliches Quecksilberdoppelsalz bildet, während das Pentamethylendiamin sich gerade umgekehrt verhält.

Bei der Untersuchung von faulem Pferdefleisch hat er ferner von der Quecksilberfällung einen in Wasser besonders leicht löslichen Teil abgetrennt, den er durch Behandeln mit H_2S in eine Lösung von Chloriden verwandelte. Diese versetzte er mit Goldchloridlösung, wodurch die in Blättchen kristallisierende, in Wasser schwer lösliche Golddoppelverbindung eines Körpers der Formel $C_7H_{17}.NO_2$ niedergeschlagen wurde. Im Filtrate

[1]) *Brieger*, Ptomaine. III. S. 42.

dieser Goldfällung befindet sich dann das Mydatoxin, welches angeblich mit Goldchlorid überhaupt nicht fallen soll, und durch seine in Wasser ziemlich leicht lösliche Platinverbindung isoliert wird.

Die Darstellungsmethoden einiger anderer von *Brieger* aus Fäulnisgemischen isolierter Basen werden gelegentlich der Besprechung der einzelnen Körper geschildert werden.

2. Verfahren nach Ackermann und Kutscher.

Dasselbe schließt sich eng an das von *Kutscher* zuerst zur Aufteilung des Fleischextraktes benutzte Verfahren an und stellt eine Kombination der Basengewinnungsmethoden von *Drechsel, Brieger, Kutscher, Kossel* und *Steudel* dar. Es wurde zuerst von *D. Ackermann* und *P. Mey*[1]), dann von mir[2]) allein zur Untersuchung eines Pankreasfäulnisgemisches benutzt und gestaltet sich im einzelnen folgendermaßen:

Die gefaulten Gewebsteile[3]) werden entweder durch ein weitmaschiges Sieb gegossen, auf dem die nicht in Lösung gegangenen Gewebsfetzen zurückbleiben. Diese werden mit Wasser einmal aufgekocht, worauf der so erhaltene wässerige Extrakt mit der Hauptflüssigkeitsmenge vereinigt und das ganze auf ca. 35 *l* eingeengt wird; stark einzuengen ist nicht ratsam, weil dann beim Abkühlen die leimhaltige Masse erstarrt. Jetzt wird mit Phosphorsäure angesäuert und bei der so hergestellten sauren Reaktion mit konzentrierter wässeriger Gerbsäurelösung gefällt, solange als noch ein Niederschlag entsteht. Von dem Niederschlag wird nach einiger Zeit abfiltriert.

Da das Durchgeben der Fäulnismassen durch ein Sieb und das nachherige Eindampfen der Flüssigkeit eine langwierige und sehr widrige Arbeit ist, habe ich bei einem neueren Versuch auf eine möglichst vollständige Ausnützung des Materials verzichtet und mich damit begnügt, nur den größten Teil der Substanzmengen zu gewinnen. Ich gab nämlich zu dem Fäulnisgemisch direkt nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure konzentrierte Tanninlösung bis zur völligen Ausfällung hinzu und ließ den Niederschlag von Gewebsfetzen und gerbsauren Eiweißverbindungen tagelang sich absetzen. Dann wird schließlich die darüberstehende saure Flüssigkeit abgegossen und in einem kupfernen Waschkessel eingeengt, während man auf die den Bodensatz durchtränkende Flüssigkeitsmenge verzichtet.

Die auf die eine oder die andere Weise erhaltene Flüssigkeit muß nun vom überschüssigen Tannin befreit werden. Man versetzt sie deshalb

[1]) *D. Ackermann* und *P. Mey*, Untersuchung eines Eiweißfäulnisgemisches nach neuen Methoden. Centralbl. f. Bakteriol. I. Abt. Bd. 42. S. 629 (1906).

[2]) *D. Ackermann*, Ein Beitrag zur Chemie der Fäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54. S. 1 (1907/08).

[3]) Ich benutzte 22 *kg* Rinderpankreas, welches, grob vom Fett befreit, in einer Fleischhackmaschine zerkleinert, mit 44 *l* Wasser verrührt, in einer großen Holztonne 2 Monate im Sommer faulen gelassen war.

solange zuerst mit heißgesättigter, später mit kalter konzentrierter Barythydratlösung, bis der sich beim Umrühren des Gemisches bildende Schaum einen roten Farbenton annimmt. Es ist dies erfahrungsgemäß ein Zeichen, daß die Flüssigkeit einen Überschuß von Barythydrat enthält, somit sämtliches Tannin in Baryumtannat übergeführt ist. Ohne den Niederschlag absitzen zu lassen, wird das Ganze auf den von *A. Kossel* angegebenen Filtrierapparat gegeben und scharf abgesaugt; die *Kossel*sche Nutsche ist für diese Arbeiten kaum zu entbehren.[1]) Den Baryumtannatniederschlag wäscht man noch dreimal gut nach, vereinigt die Waschwässer mit dem Hauptfiltrat und versetzt das Ganze mit Schwefelsäure bis zur deutlich sauren Reaktion. Nachdem so der gesamte noch in Lösung befindliche Baryt niedergeschlagen ist, wird die überschüssige Schwefelsäure durch Zugabe von Bleioxyd abgestumpft. Das Bleioxyd nimmt außerdem die Reste des Tannins und andere Verunreinigungen mit fort. Darauf beseitigt man den Baryumsulfat- und Bleiniederschlag durch Filtrieren und kann nun die Flüssigkeit einengen, ohne eine Zersetzung oder Oxydation befürchten zu müssen. Durch die Behandlung mit Tannin ist man sämtliche Eiweißkörper losgeworden, hat aber andrerseits, da die Reaktion während der Fällung mit Gerbsäure sauer war, keinen großen Verlust an Basen durch dieses Fällungsmittel zu fürchten, da die meisten Tanninverbindungen organischer Basen in Säuren löslich sind.

Ist das Volumen der Flüssigkeit nun auf ca. 1 *l* geschwunden, so werden 25 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure zugegeben und jetzt gibt man Phosphorwolframsäurelösung hinzu so lange, bis kein Niederschlag mehr entsteht.[2]) Am anderen Tage wird die Fällung abgesaugt, mehrmals mit 5%igen Schwefelsäure gewaschen und der Niederschlag dann in einem großen Blechtopf mit warmem Wasser zu einem dünnen Brei sehr sorgfältig zerrieben. Bei der nun folgenden Zersetzung des Niederschlages mit Barythydrat kann man erfahrungsgemäß heißgesättigte Barythydratlösung benutzen, ohne die Basen dadurch zu gefährden; man darf nur die Arbeit jetzt nicht unterbrechen, denn bei langem Verweilen der Körper in stark alkalischer Lösung muß doch schließlich eine Zersetzung gefürchtet werden. Man gibt unter gutem Rühren mit einer Holzkelle solange Barythydratlösung hinzu, als bis drei kleine Proben der sich über dem gebildeten Niederschlag ansammelnden Flüssigkeit folgenden drei Anforderungen genügen: Mit kaltem Barytwasser keine Fällung; mit Schwefelsäure Fällung; mit Natriumkarbonat Fällung. Nun saugt man den Niederschlag ab, was erfahrungsgemäß außerordentlich schnell geht, wäscht ihn mit heißem Wasser und leitet sofort in Filtrat und Waschwässer Kohlensäure solange

[1]) Sie ist vom Mechaniker des Physiologischen Instituts zu Marburg M. Rinck zu beziehen.

[2]) Bei meinem mit 22 *kg* Pankreas angestellten Versuch brauchte ich etwa 4 *kg* feste, nach *E. Drechsel* (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **20**. S. 1454 [1887]) dargestellte Phosphorwolframsäure. Man muß darauf achten, daß nach Zugabe der Fällungsflüssigkeit der Gesamtgehalt an Mineralsäure ungefähr 5% beträgt.

ein, bis der ganze überschüssige Baryt als Karbonat ausgeschieden ist. Vom Baryumkarbonat wird abfiltriert, nachgewaschen und nun dampft man die Lösung der kohlensauren Basen ein.

Diese wird jetzt mit Salpetersäure bis zur schwachen Blaufärbung von Kongopapier angesäuert, wobei sich, wenn man Pankreasfäulnis verarbeitet, ein noch nicht näher untersuchtes Öl abscheidet. Dieses beseitigt man am besten durch Ausschütteln mit Äther. Die salpetersaure, wässerige Basenlösung wird hierauf durch Einleiten von Luft vom Äther befreit, worauf man Silbernitratlösung hinzugibt so lange, als noch ein Niederschlag entsteht. Dieser Silberniederschlag I enthält Chlorsilber und Purinbasen. Man saugt ab und gibt zu dem Filtrat noch so viel Silbernitratlösung hinzu, daß man sicher ist, mehr von diesem Fällungsmittel verwandt zu haben als die Gesamtmenge der Basen verlangt, welche mit Silbernitrat und Baryt niedergeschlagen werden können. Man hat diesen Punkt erreicht, wenn ein Tropfen der Flüssigkeit mit einem Tropfen kalten Barytwassers auf einer Glasplatte zur Vereinigung gebracht nicht mehr eine weiße, sondern eine braune Färbung (von Silberoxyd) zeigt. Jetzt werden durch Zugabe von kaltem Barytwasser zwei weitere Silberfällungen erzeugt.

Silberfällung II ist dann vollendet, wenn die überstehende Flüssigkeit mit ammoniakalischer Silberlösung nur noch eine geringe weiße Trübung aufweist; ist man so weit gelangt, so saugt man die Silberfällung II ab, wäscht sie und setzt durch Schwefelwasserstoff die Basen in Freiheit; unter diesen ließ sich bisher nur eine Base, $C_9 H_9 N_5 O_8$, isolieren, die als Pikrat aus wässeriger Lösung niedergeschlagen und auch nur als solches analysiert wurde.

Silberfällung III erhält man, indem man zum Filtrate von Silberfällung II solange Barytwasser hinzugibt, als noch ein Niederschlag entsteht. Auch dieser ist noch wenig untersucht. Bisher wurde nur Tetramethylendiamin darin gefunden. Um dies zu gewinnen, muß man das Silber mit H_2S beseitigen, dann die Flüssigkeit eindampfen, mit Salzsäure ansäuern und mit Goldchlorid fällen.

Das Filtrat von Silberfällung III befreit man durch Salzsäure vom überschüssigen Silber, durch Schwefelsäure vom Baryt und gibt nun zum Filtrate des Chlorsilbers und Baryumsulfats nochmals Phosphorwolframsäure bis zur völligen Ausfällung. Am anderen Tage wird abgesaugt, der Niederschlag solange gewaschen, bis das Waschwasser salpetersäurefrei[1]) ist und dann aus demselben eine Lösung der kohlensauren Basen genau in der gleichen Weise hergestellt, wie es oben geschildert wurde.

Die Lösung dampft man zum Sirup ein und fällt sie mit kalt gesättigter, alkoholischer Pikrinsäurelösung vollständig aus, läßt 12 Stunden stehen, filtriert ab und wäscht mit Alkohol. In diesem Niederschlag finden

[1]) Es ist von großer Bedeutung, daß die Salpetersäure völlig ausgewaschen wird. Tut man dies nicht, so hat man später bei den mannigfachen Einengungen, denen die Lösungen der Basen unterworfen werden, unliebsame Oxydationen zu gewärtigen, besonders, da meist bei Gegenwart von Salzsäure gearbeitet wird.

sich nur Kadaverin und Putrescin; um sie zu trennen, müssen aus den Pikraten die Chloride dargestellt werden. Man löst sie zu diesem Zweck in kochendem Wasser vollständig auf und gibt zu der heißen Lösung sofort konzentrierte Salzsäure im starken Überschuß. Es hat sich dann, wenn das Ganze vollständig abgekühlt ist, schon ein großer Teil der Pikrinsäure abgeschieden, die man nach *Kutscher* jetzt gleich abfiltriert und mit verdünnter Salzsäure, in der sie sehr schwer löslich ist, auswäscht. Das erste Filtrat und die Waschsalzsäure werden nun gemeinsam in einem großen Schütteltrichter mit Äther von den Resten der Pikrinsäure befreit, worauf man die Lösung der Chloride eindampft. Man nimmt diese öfters mit 96%igem Alkohol auf und bekommt auf diese Weise eine Menge weißer Kristalle, die aus Putrescinchlorid bestehen [1]) und durch Überführung in das Goldsalz leicht identifiziert werden können. Im alkoholischen Filtrat findet sich Kadaverinchlorid, das als Platinat oder Chloraurat untersucht werden kann.

Das Filtrat der Pikrinsäurefällung muß nun gleichfalls durch Behandeln mit Salzsäure und Äther in eine wässerige Lösung von Chloriden verwandelt werden, die man zum Sirup eindampft und mehrmals mit absolutem Alkohol abdampft; man bekommt dann eine nicht unerhebliche Quantität weißer Kristalle in die Hand, welche in überwiegender Menge aus Pentamethylendiaminchlorid und nur zum geringen Teil aus Tetramethylendiaminchlorid bestehen und der Fällung mit Pikrinsäure entgangen waren. Man kocht diese Chloride mit absolutem Alkohol aus, filtriert diesen ab, wäscht die Kristalle mit absolutem Alkohol aus und hat nun in diesem alkoholischen Extrakt noch eine Reihe anderer Körper.

Um sie zu isolieren, wird dieser jetzt mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung vollständig gefällt, die Fällung am anderen Tage abgesaugt und mit diesem Fällungsmittel ausgewaschen. Man erhält jetzt *a)* eine Quecksilberfällung, *b)* ein Filtrat der Quecksilberfällung.

a) Die Quecksilberfällung wird in heißem Wasser unter Zusatz von etwas Salzsäure gelöst und mit H_2S vom Quecksilber befreit, worauf man eindampft. Der Sirup auch dieser Chloride kann bei wiederholtem Aufnehmen mit absolutem Alkohol nochmals Kristalle abscheiden, die aus Kadaverin- und Putrescinchlorid bestehen; hat man diese dann beseitigt, so fällt man die Lösung mit alkoholischer Kadmiumchloridlösung [2]) vollständig aus. Man erhält dann in der Fällung das Marcitin, im Filtrat das Putrin; beide werden als Goldverbindungen isoliert.

b) Das Filtrat der Quecksilberfällung versetzt man jetzt abwechselnd mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung und alkoholischer Natriumacetatlösung, solange als keine dieser Flüssigkeiten mehr einen Niederschlag

[1]) Ist hier noch Kaliumchlorid beigemengt, so kann man dasselbe durch Aufnehmen der Kristalle mit Methylalkohol beseitigen.

[2]) Bei der Zersetzung von Kadmiumverbindungen mit Schwefelwasserstoff ist zu beachten, daß dieselbe in der Kälte geschieht, da das Kadmiumsulfid in warmem salzsäurehaltigen Wasser löslich ist.

gibt. Dann saugt man die schmierige Fällung am anderen Tage ab, löst sie in einem großen Kolben in viel verdünnter Salzsäure und beseitigt das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff. Beim Eindampfen der Lösung wird die Essigsäure abgestoßen und Natriumchlorid[1]) scheidet sich aus, das man durch häufiges Aufnehmen und Verreiben mit absolutem Alkohol beseitigen muß. Man fällt die Mutterlauge des Kochsalzes mit heiß gesättigter alkoholischer Kadmiumchloridlösung und schlägt auf diese Weise die δ-Aminovaleriansäure und das Viridinin nieder; um diese beiden Basen voneinander zu trennen, muß die mit alkoholischer Kadmiumchloridlösung ausgewaschene Kadmiumfällung durch H_2S in eine Lösung von Chloriden verwandelt werden, die man, zum Sirup eingeengt, mit 20%iger alkoholischer Platinchloridlösung fällt. Die Fällung zerteilt man nach dem Abfiltrieren durch Aufnehmen in Wasser in einen darin unlöslichen Teil, der aus Ammoniumplatinat besteht, in einen ziemlich schwer löslichen, hauptsächlich das Platinsalz des Viridinins enthaltenden und schließlich in einen noch leichter löslichen Teil, der vorzugsweise aus dem δ-Aminovaleriansäure-Platinat besteht; das letztere Salz findet sich auch noch im alkoholischen Filtrat der zuallererst ausgeführten Platinfällung. In derselben Fraktion wie die δ-Aminovaleriansäure zeigt sich ferner ein Körper, den ich für Mydatoxin halte; eine bequeme Trennungsmethode dieses mutmaßlichen Mydatoxins von der δ-Aminovaleriansäure existiert leider nicht. Man kann bisher nur durch fraktionierte Kristallisation der Platinate beider Körper etwas erreichen.

Verfahren nach Gautier.[2])

Dasselbe ist verschiedentlich modifiziert worden. Bei Gelegenheit einiger später zu schildernder Basen wird eine Reihe dieser Modifikationen in ihrer genaueren Anwendung angegeben werden. Wir geben hier zuerst die folgende allgemein anwendbare Extraktionsmethode. Die gefaulten Gewebsmassen werden in Breiform mit Wasser ausgekocht und aus den durch gelindes Erhitzen zum Sieden von Ammoniak befreiten Extraktflüssigkeiten nach dem Filtrieren vorhandene Eiweißkörper mit Bleiacetat ausgefällt. Aus dem Filtrat der Bleifällung entfernt man den Bleiüberschuß mit Oxalsäure. Das schwach saure Filtrat vom Bleioxalatniederschlag wird zur Verjagung der flüchtigen Fettsäuren durch Destillation eingeengt, wobei man, solange das Destillat noch nach denselben riecht, von Zeit zu Zeit weitere, aber stets nur geringe Mengen Oxalsäure hinzugibt. Nachdem der Destillationsrückstand durch Versetzen mit dünner Kalkmilch von dem größten Teile der zugegebenen Oxalsäure wieder befreit ist, dampft man die Flüssigkeit — am besten im Vakuum — bis zur Konsistenz eines dicken Sirups ein, um diesem hierauf die Basenoxalate durch Be-

[1]) Ich fand mit diesem vermengt auch hier noch etwas Tetramethylendiaminchlorid.

[2]) *Guareshi-Kunz-Krause,* Einführung in das Studium der Alkaloide. Berlin 1896. S. 561. — *A. Gautier,* Traité de Chim. biolog. p. 262 (1892).

handeln mit 98%igem Alkohol zu entziehen. Der nach dem Verdunsten der alkoholischen Lösung hinterbleibende Rückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen und durch Zugabe eines der Flüssigkeitsmenge gleichen Gewichtes einer Mischung aus 2 Teilen Kreide und 1 Teil pulverigem Kalkhydrat in einen homogenen Brei verwandelt. Diesen erhitzt man hierauf solange im Wasserbade bei 35—40°, als noch Ammoniak entweicht, wobei man zugleich in geeigneter Weise für die Kondensation etwa entweichender flüchtiger Basen Sorge trägt. Der rückständigen Masse werden hierauf alle nicht flüchtigen Alkaloide durch Auskochen mit 82%igem Alkohol entzogen. Nachdem aus der alkoholischen Flüssigkeit spurweise mit in Lösung gegangener Kalk durch vorsichtig bemessene Zugabe von Oxalsäure ausgefällt ist, neutralisiert man die nochmals filtrierte alkoholische Lösung mit Salzsäure und bringt sie im Vakuum über Ätzkalk zur Verdunstung. Der Verdunstungsrückstand besteht aus den Chlorhydraten der vorhandenen Basen.

Zur weiteren Trennung derselben versetzt man ihre wässerige Lösung mit Quecksilberchlorid, filtriert nach 24stündigem Stehen von dem etwa entstandenen Niederschlag ab und entfernt aus ihm das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff, engt die Lösung der mit $HgCl_2$ fällbaren Chloride etwas ein und fällt mit Kupferacetat zunächst in der Kälte, filtriert und fällt unter Erwärmen nochmals mit Kupferacetat, wodurch die Purinbasen abgetrennt werden sollen. Jetzt wird nochmals abfiltriert und man hat nun aus dem Filtrat durch Schwefelwasserstoff das Kupfer zu beseitigen und schließlich die mit $HgCl_2$ fällbaren eigentlichen Fäulnisbasen als Chloride vor sich.

Aus dem Filtrat der Quecksilberchloridfällung muß das Metall durch Schwefelwasserstoff beseitigt werden, worauf man die so erhaltene Lösung der Chloride mit absolutem Alkohol aufnimmt, um anorganische Chloride, die jetzt ungelöst bleiben, abzusondern. Das alkoholische Filtrat von diesen wird eingedampft und mit Magnesiummilch destilliert, wobei die nicht flüchtigen im Destillationsrückstand bleiben und demselben durch Chloroform oder Äther entzogen werden. Man kann aber auch das Destillieren unterlassen und statt dessen gleich mit Platinchlorid fällen, worauf die Basen, vermöge der verschiedenen Löslichkeit ihrer Platinate, abgeschieden werden können.

Der nach der Alkoholbehandlung hinterbleibende Kalkrückstand kann noch einige feste Basen enthalten. Um auch diese zu gewinnen, säuert man denselben mit Oxalsäure schwach an und extrahiert ihn mit siedendem Wasser. Der wässerige Auszug wird nach dem Neutralisieren mit einigen Tropfen Kalkwasser filtriert und eingedampft. Der Verdampfungsrückstand enthält die in Alkohol schwer löslichen Basen.

Der von *Brieger* gegen diese Methode erhobene Einwand, daß bei der Extraktion der alkalischen Basenflüssigkeit mit Chloroform Gelegenheit zur Bildung von Carbylaminen gegeben sei, hat sich als grundlos erwiesen.

In der nun folgenden Besprechung der aus Fäulnisgemischen und Bakterienkulturen gewonnenen Basen sind diese nach steigender Zahl der C-Atome geordnet.

Methylamin, CH_5N, dargestellt aus faulen Fischen[1], durch Einwirkung von Streptokokken auf Fibrin[2] und der Einwirkung von Bac. fluorescens liquefaciens auf Handelsgelatine[3]), aus dem sogenannten Gärfisch[4]), aus giftiger Wurst[5]), durch anaerobe Fäulnis von Cholin[6]), aus Tetanuskulturen.[7])

Das Methylamin ist ein farbloses, mit gelber Flamme brennendes, bei —6° zu einer farblosen Flüssigkeit verdichtbares Gas von ammoniakalischem Geruch. 1 Vol. Wasser löst bei 12·5° 1150 Vol. Methylamingas. Es liefert eine gelbe Fällung mit *Nesslers* Reagens.

Platinat, $(CH_5N)_2 . 2HCl . PtCl_4$, in kaltem Wasser schwer löslich, in Alkohol absolut unlöslich. Hexagonale Tafeln.

Chlorid, $CH_5N . HCl$, bildet, im trockenen Rohr erhitzt, ein Sublimat, das schmilzt, im Gegensatz zum Ammoniumchlorid, dessen Sublimat sich bei erneutem Erhitzen trocken ablöst.

Pikrat, $CH_5N . C_6H_2(NO_2)_3OH$, schwer löslich. Schmelzpunkt 207°.

Pikrolonat, $CH_3N . 2 . C_{10}H_8N_4O_5$, schwer löslich. Zersetzungspunkt 244°.

Die Darstellung des Methylamins siehe bei der *Brieger*schen Methode.

C_2H_5N[8]) wurde aus Kulturen von Cholerabazillen gewonnen. Bildet ein in Wasser schwer lösliches Platinat.

Darstellung der Base C_2H_5N nach J. Kunz.

300 *g* trockenes Serumeiweiß und vier frische, fein zerhackte Ochsenpankreasdrüsen werden mit 6 *l* Wasser bei Bruttemperatur während 16 Stunden stehen gelassen. Hierauf wird die Masse mit Essigsäure schwach ange-

[1]) *Bocklisch* in *Briegers* Monographie über Ptomaine. III. und *Bocklisch*, Über Fäulnisbasen (Ptomaine) aus Fischen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 1922 (1885).

[2]) *Emmerling*, Die Zersetzung von Fibrin durch Streptokokken. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 1863 (1897).

[3]) *Emmerling* und *Reiser*, Zur Kenntnis eiweißspaltender Bakterien. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 701 (1902).

[4]) *C. Th. Mörner*, Über ein eigentümliches Nahrungsmittel, nebst einigen Beobachtungen über darin angetroffene Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **22**. S. 514 (1896/97).

[5]) *A. Ehrenberg*, Über einige in einem Falle von sog. Wurstvergiftung aus dem schädlichen Materiale dargestellte Fäulnisbasen sowie über einige durch die Tätigkeit eines besonderen, im gleichen Materiale aufgefundenen Bazillus gebildete Zersetzungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **11**. S. 239 (1886).

[6]) *Hasebrock*, Über das Schicksal des Lecithins im Körper und eine Beziehung desselben zum Sumpfgas im Darmkanal. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 148 (1888).

[7]) *Brieger*, Zur Kenntnis der Ätiologie des Wundstarrkrampfes, nebst Bemerkungen über das Cholerarot. Deutsche med. Wochenschr. Jg. 1887. S. 303 und 469.

[8]) *Kunz*, Bakteriologisch-chemische Untersuchungen einiger Spaltpilzarten. Monatshefte für Chemie. Bd. **9**. S. 361 (1888).

säuert, erwärmt und durch ein Tuch koliert. Die Flüssigkeit wird nun mit Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht, filtriert und in gewohnter Weise sterilisiert. Jetzt infiziert man mit Cholerabazillen, läßt drei Tage bei 35° stehen und nun wird nach *Briegers* Methode folgendermaßen weitergearbeitet. Man säuert die Kulturen mit Salzsäure ganz schwach an, kocht auf, filtriert und dampft das Filtrat zum Sirup ein. Jetzt wird mit 95%igem Alkohol aufgenommen, von den niedergeschlagenen Bestandteilen abfiltriert, das Filtrat zum Sirup eingeengt und nochmals mit Alkohol aufgenommen, worauf man den alkoholischen Auszug mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung fällt. Den so erhaltenen Niederschlag führt man durch Behandeln mit Schwefelwasserstoff in eine Lösung der Chloride über, welche mit Soda bis zur ganz schwach sauren Reaktion abgestumpft, eingeengt wird. Den Sirup nimmt man mit absolutem Alkohol auf, verjagt aus dem Auszug den Alkohol und extrahiert den so erhaltenen Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol, worauf man diesen alkoholischen Extrakt mit alkoholischer Platinchloridlösung fällt. Der kristallinische Niederschlag wird abgesaugt und aus heißem Wasser zweimal umkristallisiert. Jetzt hat man noch ein Gemenge von mindestens zwei Salzen vor sich, aus dem dasjenige der gewünschten Base das in Wasser am schwersten lösliche ist. Man gewinnt es wohl am besten durch Aufschwemmen des Salzgemenges in kaltem Wasser und muß dann die Verbindung noch mehrmals umkristallisieren, ehe sie rein ist. Die Formel $(C_2H_5N)_2 . 2HCl . PtCl_4$ wurde übrigens nur auf Grund von einer Kohlenstoff-Wasserstoff- und einer Platinbestimmung erschlossen. Eine Analyse des Stickstoffgehaltes konnte wegen Materialmangels nicht ausgeführt werden. *Kunz* hält die Base für Spermin.

Dimethylamin, C_2H_7N, gewonnen aus faulen Fischen, sowie aus Heringslake[1]), aus faulem Leim[2]), aus giftiger Wurst.[3])

Es muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß die Verdoppelung der Formel des Dimethylamins die eines Körpers ergibt, der sich nur um 2 H-Atome von dem Tetramethylendiamin unterscheidet; die Salze des Dimethylamins und Tetramethylendiamins differieren infolgedessen auch nur um 2 Wasserstoffatome. Es liegt deshalb die Gefahr vor, die beiden Körper miteinander zu verwechseln.

Wir glauben, daß *Brieger* dies einmal getan hat, als er bei der Leimfäulnis Dimethylamin statt Tetramethylendiamin gefunden haben wollte. — Weiter aber muß man beachten, daß äquimolekulare Mengen von Mono- und Trimethylamin das Vorhandensein von Dimethylamin vortäuschen können, denn die Summe von beiden Formeln der erstgenannten Körper ($CH_5N + C_3H_9N = C_4H_{14}N_2$) ist gerade doppelt so groß, wie die Formel des Dimethylamins (C_2H_7N).

[1]) *Bocklisch* bei *Brieger*, Ptomaine. III. und Über Fäulnisbasen (Ptomaine) aus Fischen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 18. S. 86 (1885).

[2]) *Brieger*, Ptomaine. III. S. 53.

[3]) *Ehrenberg*, loc. cit.

Das Dimethylamin bildet eine farblose, bei + 7·2—7·3° siedende, in Wasser und in Alkohol leicht lösliche Flüssigkeit von ammoniakalischem, jedoch schon an Trimethylamin erinnernden Geruch. Mit *Nesslers* Reagens gibt es keine Fällung.

Chlorhydrat, $C_2H_7N.HCl$, ist im Gegensatz zum Monomethylaminchlorid in Chloroform löslich. Nadeln. In Alkohol unlöslich.

Platinsulfocyanat, $([CH_3]_2NH.HCNS)_2.Pt(CNS)_4$, kristallisiert in oftmals ziemlich langen Prismen oder Nadeln, es schmilzt unter Schwärzung bei 160—170° und ist wenig löslich in kaltem, leichter in heißem Wasser und in Alkohol, unlöslich in Äther.

Platinat, $(C_2H_7N)_2 2HCl.PtCl_4$. Blättchen, die in heißem Wasser leicht, in kaltem nicht so leicht löslich sind.

Aurat, $C_2H_7N.HCl AuCl_3$. Große, monokline Tafeln.

Pikrolonat, $(CH_3)_2NH.C_{10}H_8N_4O_5$, schwer löslich in Wasser und Alkohol. Zersetzungspunkt 222°.

Pikrat, $(CH_3)_2NH.C_6H_3N_3O_7$, in Wasser ziemlich löslich; Schmelzpunkt 156°.

$C_2H_8N_2$. Aus faulem Leim.[1]) Das Chlorid ist in Wasser leicht löslich, in absolutem Alkohol unlöslich, bildet lange glänzende Nadeln. Mit Goldchlorid entsteht keine Verbindung. Das Platinat, $C_2H_8N_2.2HCl.PtCl_4$, ist in Wasser ziemlich schwer löslich. Darstellung siehe bei der Methode *Briegers* zur Gewinnung des Neuridins.

Anthracin, $C_3H_6N_2$, aus mit Milzbrand vergifteten Kaninchen gewonnen.[2]) Nähere Angaben über die Darstellung des Anthracins macht *Hoffa* nicht. Doch arbeitete er unter *Briegers* Leitung mit dessen Methoden und isolierte die Base als Platinat neben Methylguanidin.

$C_3H_8N_2$. Aus Reinkulturen von Kommabazillen auf Rindfleischbrei; die Analysen stimmten nicht scharf.[3])

Darstellung der Base $C_3H_8N_2$ nach Brieger.

Mehrere Literkolben werden je mit etwa 250 *g* Rindfleischbreiaufschwemmung versetzt, welcher 3°/$_0$ Soda zugegeben wird. Nach dem Sterilisieren und Aussäen der Kommabazillen hält man die Kulturen ca. 6 bis 8 Wochen lang bei 37—38°. Dann ist meist alles in Lösung gegangen. Man sterilisiert jetzt im Dampftopf 1$^1/_2$ Stunden lang, filtriert heiß und dampft das Filtrat ein, worauf in der oben ausführlich geschilderten Weise der Quecksilberniederschlag erzeugt wird. Derselbe muß durch H_2S in eine Lösung der Chloride verwandelt werden, die man einengt und mit Natriumpikratlösung fällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und nun mit

[1]) *Brieger*, Ptomaine. Bd. 1. S. 44 und Bd. 2. S. 2.

[2]) *Hoffa*, Zur Lehre der Ptomaine. Sitzungsber. d. phys.-med. Gesellschaft zu Würzburg. S. 96 (1889).

[3]) *Brieger*, Zur Kenntnis der Stoffwechselprodukte des Cholerabazillus. Berl. klin. Wochenschr. Nr. 44 (1887).

absolutem Alkohol gekocht, worauf Kadaverinpikrat, das in Alkohol schwer löslich ist, zurückbleibt, und nun filtriert man ab. Im Filtrat hat man die Pikrate des Kreatinins und der Base $C_3H_8N_2$. Um diese zu trennen, wird die Pikratlösung mit Salzsäure und Äther geschüttelt und so in die Chloride verwandelt. Man dampft ein und fällt mit Platinchlorid, wodurch die fragliche Base niedergeschlagen wird, während das Kreatininplatinat in Lösung bleibt. — Um die Base zu analysieren, hat *Brieger* nicht dieses schwer lösliche Platinat derselben benutzt, sondern dasselbe erst wieder in das Pikrat zurückverwandelt.

Trimethylamin, C_3H_9N. Gewonnen aus Zersetzung von Weizenkleber durch Proteus vulgaris)[1], bei Einwirkung von Bacillus liquefaciens auf Handelsgelatine[2]), aus Gärfisch[3]), aus Kulturen von Proteus vulgaris auf Fleisch[4]), aus Gorgonzolakäse[5]), aus giftiger Wurst[6]) und aus faulem Fleisch.[7])

Das Trimethylamin ist wohl stets auf das im Lecithin der zur Fäulnis gelangten Massen enthaltene Cholin oder andere den Trimethylaminkern enthaltende Basen, nicht aber auf das Eiweiß zurückzuführen. Es ist ein farbloses, durch Abkühlen zu einer ebenfalls farblosen, bei 3·2—3·8° siedenden Flüssigkeit verdichtbares Gas von intensivem Fischgeruch. In Wasser ist es leicht zu einer alkalisch reagierenden Flüssigkeit löslich; es ist jedoch eine schwächere Base, als Di- und Monomethylamin.

Nesslers Reagens gibt keinen Niederschlag mit Trimethylamin.

Zur Identifizierung der Base eignet sich gewiß am besten das

Chloraurat, $CH_3N . HCl AuCl_3$, welches in Wasser und Alkohol wenig lösliche, gelbe, monokline Kristalle bildet. Schmelzpunkt 223—226°.

Chlorplatinat, $(CH_3N)_2 . 2 HCl . PtCl_4$, besteht aus regelmäßigen, gelben, bei 190° schmelzenden Kristallen, die in Alkohol ziemlich schwer löslich sind, doch immer noch löslicher, als die des Dimethylaminplatinates, das seinerseits wieder löslicher als das Monomethylaminplatinat sein soll.

---

[1]) *Emmerling*, Beitrag zur Kenntnis der Eiweißfäulnis. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **29**. S 2721 (1896).

[2]) *Emmerling* und *Reiser*, Zur Kenntnis eiweißspaltender Bakterien. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 701 (1902).

[3]) *C. Th. Mörner*, Über ein eigentümliches Nahrungsmittel, nebst einigen Beobachtungen über darin angetroffene Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **22**. S. 514 (1896/97).

[4]) *Carbone*, Über die von Proteus vulgaris erzeugten Gifte. Zentralbl. f. Bakteriologie. Bd. **8**. S. 768 (1890); Riforma medica. Nr. **202** (1890); Zentralbl. f. klin. Medizin. Bd. **12**. S. 594 (1891).

[5]) *V. Malenchini*, Über Ptomaine im Käse. Zeitschr. f. Nahrungsmittelunters. und Hygiene. Bd. **7**. S. 7 (1892).

[6]) *A. Ehrenberg*, Über einige in einem Falle von sog. Wurstvergiftung aus dem schädlichen Materiale dargestellten Fäulnisbasen sowie über einige durch die Tätigkeit eines besonderen, im gleichen Materiale aufgefundenen Bazillus gebildete Zersetzungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **11**. S. 239 (1887).

[7]) *Gautier* und *Etard*, Sur les produits dérivés de la fermentation bacterienne des albuminoides. Compt. rend. T. **97**. p. 263 und 325 (1883).

Platinsulfocyanat, $(CH_3N.HCNS)_2.Pt(CNS)_4$, bildet rote Täfelchen, welche in Wasser wenig, in Alkohol leichter, in Äther nicht löslich sind und bei 175—180° unter Zersetzung schmelzen.

Pikrat, $(CH_3)_3N.C_6H_3N_3O_7$. Löslich in 77 Teilen Wasser. Schmelzpunkt 216°.

Pikrolonat, $(CH_3)_3N.C_{10}H_8.N_4O_5$. Schwer löslich in Wasser und Alkohol. Zersetzungspunkt 250—252°.

Die Darstellung des Trimethylamins siehe bei der Methode *Briegers*.

$C_4H_{11}N$, **n-Butylamin**, aus Lebertran (*Gautier* und *Mourgues*[1]). Durch Fäulnis von d, l-α-Aminoisovaleriansäure wurde von *Neuberg* und *Karczag*[2]) ein Butylamin erhalten, das wahrscheinlich Iso-butylamin war.

Das Normal-Butylamin siedet bei 75·5° und ist löslich in Wasser. Das Chloroplatinat bildet goldgelbe, in kaltem Wasser schwer lösliche Blättchen; *Gautier* und *Mourgues* beschrieben ihr Butylaminplatinat als goldgelbe, leicht lösliche Blättchen. Darstellung siehe am Schluß dieses Kapitels.

Gewinnung von Iso-Butylamin nach Neuberg und Karczag.

10 *g* razemische Aminoisovaleriansäure werden in 450 *cm*³ heißem Wasser gelöst, bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Natriumkarbonat versetzt und nach Zusatz je eines Tropfens Chlorkalium, Dinatriumphosphat und Magnesiumsulfat mit einigen Tropfen eines Fäulnisgemisches versetzt. Nach vierwöchentlichem Stehen im Brutschrank, während welcher Zeit öfters durch Zugabe von Soda für alkalische Reaktion gesorgt werden muß, wird die Lösung mit 30 *cm*³ Schwefelsäure von 20% angesäuert und im Dampfstrom 36 Stunden lang destilliert. Die Schwefelsäure wird jetzt aus dem Destillationsrückstand mit Barytwasser entfernt und die schwach alkalische Lösung mit Äther ausgeschüttelt; den ätherischen Auszug säuert man mit Salzsäure an und destilliert dann den Äther ab. Hierauf wird der Rückstand mehrmals mit heißem absoluten Alkohol extrahiert; man sammelt dann die alkoholischen Auszüge, verdunstet daraus den Alkohol, nimmt den Rückstand mit wenig Wasser auf und fällt jetzt mit einer konzentrierten Platinchloridlösung. Der kristallinische Niederschlag wird noch einmal aus siedendem Wasser umkristallisiert und stellt jetzt reines Butylaminplatinat vor.

$C_4H_{12}N_2$. **Tetramethylendiamin** (Putrescin: 1.4-Diaminobutan, $NH_2CH_2.CH_2.CH_2CH_2.NH_2$), ist eine farblose, bei 156—157° siedende Flüssigkeit, die im Geruch an Piperidin und zugleich an Sperma erinnert. Durch Abkühlen erstarrt dieselbe zu einer bei 23 und 24° schmelzenden blättrigen Kristallmasse; die Base ist mit Wasserdämpfen ziemlich schwer flüchtig und zieht CO_2 aus der Luft an. Das Putrescin ist ungiftig.

[1]) *A. Gautier* und *L. Mourgues*, Sur les alcaloides de l'huile de foie de morue. Compt. rend. T. **107**, p. 110 et 626 (1889); Alcaloides volatiles de l'huile de foie de morue. Ibid. T. **107**. 254 (1889).

[2]) *Neuberg* und *Karczag*, Verhalten von d, l-α-Aminoisovaleriansäure bei der Fäulnis. Biochem. Zeitschr. Bd. **18**. S. 434 (1909).

Chlorhydrat, $C_4H_{12}N_2 . 2HCl$, kristallisiert in langen durchsichtigen, in absolutem Alkohol unlöslichen, in 96%igem Alkohol schwer löslichen Nadeln. Im letzteren Lösungsmittel löst sich Kadaverinchlorhydrat leicht, so daß die beiden Basen auf diese Weise getrennt werden können.

Platinat, $C_4H_{12}N_2 . 2HCl . PtCl_4$, in Wasser schwer löslich, kristallisiert aus der wässerigen Lösung in feinen Prismen oder hexagonalen Blättchen.

Chloraurat, $C_4H_{12}N_2 . 2HCl . 2AuCl_3 + 2H_2O$, kristallisiert wie das Platinat in Blättchen und ist wie dieses in Wasser nur schwer löslich im Gegensatz zum Aurat des Kadaverins, das etwas leichter löslich ist.

Pikrat, $C_4H_{12}N_2 . 2[C_6H_2(NO_2)_3 . OH]$, zersetzt sich bei 250°, ist in Wasser schwer löslich.

Pikrolonat, $C_4H_{12}N_2 . 2C_{10}H_8N_4O_5$, schwer löslich in Wasser und Alkohol. Zersetzungspunkt 263°.

Dibenzoylderivat, $C_4H_{10}N_2 . 2(C_6H_5CO)$, schmilzt bei 175—176°. Bildet langgestreckte Nadeln, die durch Schütteln von Putrescin mit Benzoylchlorid und Natronlauge zu erhalten sind; in Wasser unlöslich, in Alkohol schwer löslich; im Gegensatz zur Dibenzoylverbindung des Kadaverins läßt sich die des Putrescins aus der alkoholischen Lösung durch überschüssigen Äther zur Abscheidung bringen.

Phenylisocyanatputrescin, $C_4H_{10}N_2 . (C_6H_5CONH)_2$, kristallisiert aus warmem Pyridin oder einem Gemisch von letzterem mit Aceton in Nadeln aus. Schmelzpunkt 240° (korr.). Unlöslich in Wasser, Essigäther, Aceton, Schwefelkohlenstoff, kaltem Alkohol, nur sehr wenig in heißem Alkohol löslich.

Das Tetramethylendiamin wurde erhalten unter den Fäulnisprodukten der Eiweißkörper, im gefaulten Fleische, faulen Fischen, menschlichen Leichen, Cholerakulturen [1]), im Emmentaler Käse [2]), aus autolysiertem Schweinemagen [3]), bei der Fäulnis des Ornithins [4]), bei der Digestion von Ornithin mit Lebergewebe [5]), aus Harn und Fäzes bei Zystinurie [6]), aus den Dejektionen und dem Harn von Patienten mit Diarrhöe [7]),

[1]) *Brieger*, Ptomaine II, III.

[2]) *Winterstein* und *Thöny*, Beiträge zur Kenntnis der Bestandteile des Emmentaler Käses. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 28 (1902).

[3]) *Lawrow*, Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 312 (1901).

[4]) *A. Ellinger*, Die Konstitution des Ornithins und des Lysins. Zugleich ein Beitrag zur Chemie der Eiweißfäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 334 (1900). — *D. Ackermann*, Über die Entstehung von Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 482 (1909).

[5]) *Dakin*, Oxydation von Aminosäuren mit der Produktion von biologisch wichtigen Substanzen. Journ. of biological chemistry. Vol. **1**. p. 171 (1906).

[6]) *Udransky* und *Baumann*, Das Benzoylchlorid als Reagens. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 2744 (1888); Über die Identität des Putrescins und des Tetramethylendiamins. Ebenda. Bd. **21**. S. 2938 (1888). — Dieselben, Über das Vorkommen von Diaminen, sog. Ptomainen bei Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **13**. S. 562 (1889). — *Löwy* und *Neuberg*, Über Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **43**. S. 338 (1904/5).

[7]) *Roos*, Über das Vorkommen von Diaminen bei Krankheiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **16**. S. 192 (1891).

aus der Fäulnis von Kasein, das der Hydrolyse mit Säuren unterworfen war.[1])

Die Konstitution des Putrescins als 1-4-Diaminobutan ist sichergestellt.[2]) Es leitet sich bei der Fäulnis vom Arginin ab.[3])

$C_5 H_6 NO_2$[4]), aus der Zersetzung von Peptongelatine durch Micrococcus Tetragenus[5]) kristallisiert in weißen Nadeln, löslich in Wasser, schwach alkalisch reagierend. Bildet ein kristallinisches Chlorhydrat sowie kristallinische Gold- und Platindoppelverbindungen. Gibt Niederschläge mit Pikrinsäure, Tannin, *Nesslers* Reagens. Die Substanz ist giftig. Über die Darstellung gibt *Griffiths* nur an, daß er die Methoden von *Brieger* und *Gautier* benutzt habe.

$C_5 H_{11} N$. **Tetanotoxin.** Bei der Zersetzung von Gehirnmasse und Rindfleisch durch Tetanusbazillen erhalten[6]) aus Tetanusreinkulturen.[7]) Leicht lösliches, bei 205° schmelzendes Chlorid. Leicht lösliches Chloraurat vom Schmelzpunkt 130°. Schwer lösliches Platinat vom Zersetzungspunkt 240°. Pikrat löslich. Die Base ist mit Piperidin isomer, aber nach *Brieger* nicht mit ihr identisch.

Darstellung des Tetanotoxins nach Brieger.

4—6 Wochen alte Tetanuskulturen auf Rindfleisch[8]) werden mit Salzsäure angesäuert, aufgekocht und filtriert. Das Filtrat, zum Sirup eingedampft, wird mit wässeriger Bleiacetatlösung und Alkohol versetzt. Vom Unlöslichen wird dann abfiltriert, das Blei aus dem Filtrat möglichst als Chlorblei entfernt, der Alkohol verdunstet und die letzten Spuren von Blei durch Schwefelwasserstoff weggeschafft. Das alsdann stark alkalisierte Filtrat wird nun im Dampfstrom destilliert, das Destillat mit Salzsäure angesäuert zur Trockne eingedampft und zwecks Ausscheidung des Salmiaks mit

[1]) *D. Ackermann*, Über die Entstehung von Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 482 (1909).

[2]) *D. Ackermann*, Zur Kenntnis des Putrescins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **53**. S. 545 (1907).

[3]) *Ellinger*, l. c. — *D. Ackermann*, Über die Entstehung von Fäulnisbasen. Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 482 (1909).

[4]) Anmerkung. Es muß bemerkt werden, daß diese Formel nicht möglich ist, da sie dem Gesetz der paaren Atomzahlen widerspricht. Es müßte heißen $C_5 H_5 NO_2$ oder $C_5 H_7 NO_2$.

[5]) *Griffiths*, Sur une ptomaine, obtenue par la culture du Micrococcus tetragenus. Compt. rend. T. **115**. p. 418 (1892).

[6]) *Brieger*, Über ein neues, Krämpfe verursachendes Ptomain. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **19**. S. 3119 (1886). — Derselbe, Zur Kenntnis der Ätiologie des Wundstarrkrampfes, nebst Bemerkungen über das Cholerarot. Deutsche med. Wochenschrift. Jg. **1887**. S. 304

[7]) *Kitasato* und *Weyl*, Zur Kenntnis der Anaeroben. Zeitschr. f. Hygiene. Bd. 8. S. 404 (1890).

[8]) Über die Anstellung einer solchen Kultur siehe beim Tetanin.

absolutem Alkohol aufgenommen. Nach Verjagen des Alkohols fällt man die Base mit wässeriger Goldchloridlösung als ein in Blättchen kristallisierendes Doppelsalz. Bisweilen ist auch noch etwas Putrescin im Destillat enthalten, das durch sein schwer lösliches Pikrat abgetrennt werden kann.

δ-Amino-n-valeriansäure, $C_5H_{11}NO_2$. Zuerst dargestellt von *E.* und *H. Salkowski* aus gefaultem Leim und Eiweiß[1]), später von mir aus faulem Pankreasgewebe.[2]) Anfangs fälschlich von mir als eine neue Base mit dem Namen Putridin beschrieben. Perlmutterglänzende Blättchen, die in Wasser löslich, in absolutem Alkohol fast unlöslich sind und bei 157—158° schmelzen. Sie verhält sich im Gegensatz zu α-Aminosäuren indifferent gegen Kupferacetat, Kupferoxyd und auch indifferent gegen ammoniakalische Silberlösung und fällt mit Phosphorwolframsäure. Das Chlorid destilliert, trocken erhitzt, zum großen Teil unzersetzt.[2]) Die δ-Amino-n-valeriansäure leitet sich bei der Fäulnis vom Arginin her.[3]) Sehr charakteristisch ist das schöne, allerdings in Wasser nicht sehr schwer lösliche Goldsalz,

$$C_5H_{11}NO_2 . HCl . AuCl_3 + H_2O,$$

das orangegefärbte, monokline Kristalle bildet vom Schmelzpunkt 86—87°. Das Platinat ist in Alkohol ziemlich schwer löslich. Die α-Naphtylisocyanatverbindung schmilzt bei 195—196°.

Über die Gewinnung der Base, denn als solche kann man den Körper wohl ansprechen, siehe das Verfahren von *Ackermann* und *Kutscher*. Anders gingen zur Isolierung des Körpers die Entdecker selbst vor.

Isolierung der δ-Amino-n-valeriansäure nach E. und H. Salkowski.

2 *kg* gut ausgewaschenes Blutfibrin, 8 *l* Wasser, 2 *g* Kaliummonophosphat und 1 *g* Magnesiumsulfat + 200 cm^3 gesättigter Sodalösung mit einigen Tropfen und Stückchen einer Fleischfäulnis versetzt, werden 6 Tage bei 42° belassen. Jetzt destilliert man, bis der Rückstand dick wird, gibt von neuem Wasser zu und destilliert nochmals. Nun wird der Rückstand mit Chlorbaryumlösung versetzt, wobei die höheren Fettsäuren als Barytseifen ausfallen. Von ihnen und dem sonstigen Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt, um weitere Säuren zu beseitigen. Jetzt dampft man den wässerigen, ausgeätherten Teil, welcher an Mineralsubstanzen vor allem Kochsalz und Chlorbaryum enthält, möglichst vollständig zur Trockne ein und nimmt ihn mit absolutem Alkohol auf. Der alkoholische Auszug wird verdunstet und der Rückstand noch so oft mit absolutem Alkohol aufgenommen, bis

[1]) *E.* und *H. Salkowski*, Über basische Fäulnisprodukte. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **16**. S. 1191 (1883); Über δ-Aminovaleriansäure. Bd. **31**. S. 776 (1898).

[2]) *D. Ackermann*, Ein Fäulnisversuch mit Arginin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **56**. S. 305 (1908).

[3]) *D. Ackermann*, Über die Entstehung von Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 482 (1909).

man ein vollständig in diesem Lösungsmittel lösliches Chlorid vor sich hat, welches bei längerem Stehen im Exsikkator strahlig kristallinisch erstarrt. Man gibt zur alkoholischen Lösung dieses Chlorides nun alkoholische Platinchloridlösung und führt den so erhaltenen Niederschlag nach dem Zersetzen mit H_2S in ein Goldsalz über.

$C_5H_{12}N_2O_4$. Aus faulen Knochen, Fleisch etc.[1]) Platinat in Alkohol und in Äther unlöslich. Die Darstellung sieh bei der Base $C_7H_{18}N_2O_6$.

$C_5H_{13}N$. Isomylamin, $(CH_3)_2 . CH . CH_2CH_2 . NH_2$. Aus Lebertran, im Tieröl, aus gefaulter Hefe.[2]) Ferner aus fauler Plazenta[3]), aus gefaultem Pferdefleisch.[4]) Farblose, stark alkalisch reagierende, bei 96—98° siedende Flüssigkeit von unangenehmem Geruch. Das Chlorid bildet schöne zerfließliche Kristalle von unangenehmem, bitterem Geschmack. Platinat kristallisiert in dünnen, goldgelben, in siedendem Wasser leicht löslichen Blättchen. — Über die Isolierung dieses Körpers neben p-Hydroxyphenyläthylamin und Phenyläthylamin aus faulem Pferdefleisch siehe die beim Oxyphenyläthylamin geschilderte Methode von *Barger* und *Walpole*.

Das Isoamylamin soll bei der Fäulnis aus Leucin durch Abspaltung von CO_2 entstehen.

Sepsin, $C_5H_{14}N_2O_2$. Aus fauler Hefe.[5]) Aus den Bouillon- und Agarkulturen eines als Bacterium sepsinogenes bezeichneten Bazillus.[6]) In Wasser und Alkohol leicht lösliche, in freiem Zustande nicht haltbare Base. Auch das Sulfat, $C_5H_{12}N_2O_2 . H_2SO_4$, welches zur Isolierung und Analyse diente, hält sich nicht lange, ist leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol und bildet eine aus verfilzten Nadeln bestehende voluminöse Masse. Durch häufiges Eindampfen des Sulfates verwandelt es sich unter Verlust von O_2 in Kadaverinsulfat. Weitere qualitative Reaktionen siehe im Original.

Darstellung des Sepsins nach Faust.

Man läßt etwa 5 *kg*, am besten gewaschene, Preßhefe, mit etwa 3 bis $3^1/_2$ *l* Wasser übergossen, im Sommer im Freien stehen. Nach etwa vierwöchentlichem Stehen hat meist die Hefe die gewünschte Giftigkeit erreicht, von deren Vorhandensein man sich aber erst überzeugen muß, sonst hat die weitere Verarbeitung keinen Sinn. — Man injiziert zu dem

[1]) *Pouchet*, Recherches sur les ptomaines et composés analogues. Compt. rend. T. **97**. p. 1560 (1883).

[2]) *A. Müller*, Jahresber. über die Fortschr. d. Chemie. Jg. **1857**. S. 403.

[3]) *Rosenheim*, The pressor principles of placenta extracts. Journ. of Physiol. Vol. **38**. p. 337 (1909).

[4]) *Barger* und *Walpole*, Isolation of the pressor principles of putrid meat. Journ. of Physiol. Vol. **38**. p. 343 (1909).

[5]) *Faust*, Über das Fäulnisgift Sepsin. Archiv f. exper. Path. u. Pharm. Bd. **51**. S. 248 (1904).

[6]) *Fornet* und *Heubner*, Versuche über die Entstehung des Sepsins. Archiv f. exper. Path. u. Pharm. Jg. **1908**. Suppl. *Schmiedeberg*-Festschrift. S. 176.

Zwecke 20 cm^3 der Fäulnisflüssigkeit, nachdem sie durch Papier filtriert ist, einem Hunde von 6—8 *kg* Körpergewicht langsam in die Vena saphena, worauf das Tier innerhalb 12 Stunden unter folgenden Erscheinungen sterben muß. Zuerst zeigt sich Beschleunigung und Vertiefung der Respiration und oft schon während der Injektion Erbrechen und nun verstärkte Darmperistaltik mit Kotentleerungen, die immer dünnflüssiger und zuletzt ganz blutig werden. Schließlich wird die Atmung tief und wenig frequent und in komatösem Zustande, ohne Krämpfe, geht das Tier zugrunde. — Bei der Sektion zeigt die Magen- und Darmschleimhaut starke Hyperämie mit Ekchymosen.

Hat die Hefefäulnis diesen Wirkungsgrad erreicht, so wird sie zunächst unter öfterem Umrühren 24—36 Stunden auf dem Dialysator gelassen. Das alkalische Dialysat wird nun mit Salzsäure schwach angesäuert und mit Sublimatlösung versetzt; von dem hierdurch entstehenden geringen Niederschlag filtriert man ab; das Filtrat soll jetzt ca. 20 *l* betragen; es wird mit Sodalösung stark alkalisch gemacht und nun mit Quecksilberchloridlösung [1]) und Natriumkarbonatlösung solange versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Um nun gut abfiltrieren zu können, gibt man am besten etwas Kochsalzlösung hinzu, wodurch die Flüssigkeit sich klärt; der Niederschlag muß nun solange gewaschen werden, bis das Waschwasser desselben neutral reagiert; zu dem Zwecke schwemmt man ihn am besten in einem hohen, engen Standgefäß auf, läßt absitzen und hebert die überstehende Flüssigkeit ab; schließlich saugt man den Quecksilberniederschlag noch einmal scharf ab. Das Natriumkarbonat muß nämlich sorgfältig entfernt werden. Auch muß berücksichtigt werden, daß sich der Quecksilberniederschlag bei Licht unter Dunkelfärbung schwarz färbt, solange die ihn umgebende Flüssigkeit alkalisch ist und gleichzeitig das Sepsin hierbei zerstört wird. Man arbeite also möglichst an einem dunklen Ort, jedenfalls nicht im intensiven Tageslicht.

Die Quecksilberfällung zersetzt man nun mit Schwefelwasserstoff, saugt vom Schwefelquecksilber ab und beseitigt aus dem Filtrat das überschüssige Gas durch Einleiten von Luft. Zur Entfernung der Salzsäure wird die Flüssigkeit dann mit frischem, sorgfältig gewaschenem, kohlensaurem Silber versetzt und dann vom Chlorsilber und überschüssigem Silberkarbonat abfiltriert. [2])

Das Filtrat wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom gelösten Silber befreit und nachdem dieses abgesaugt und der überschüssige

[1]) Man kann hierzu eine alkoholische Lösung nehmen, um die Flüssigkeit nicht zu sehr anschwellen zu lassen.

[2]) Anmerkung: Die Entfernung der Salzsäure kann auch in der Weise geschehen, daß man während der Zerlegung des Quecksilberniederschlages mit H_2S Natriumkarbonat in kleinen Mengen zugibt, so daß die überstehende Flüssigkeit immer nur noch schwach sauer reagiert. Ist die Zersetzung des Niederschlages eine vollständige, so wird abfiltriert und nun das schwach saure Filtrat vollständig neutralisiert oder schwach alkalisch gemacht, darauf, wie im obigen weiter geschildert, eingeengt und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen, wobei nur geringe Mengen Kochsalz in den Alkohol übergehen. Auf diese Weise wird das Verfahren einfacher und billiger.

Schwefelwasserstoff durch Lufteinleiten entfernt ist, hat man ca. 5—8 *l* einer alkalischen, gelben Flüssigkeit vor sich, welche die geschilderte Giftwirkung aufweist, allerdings, aus unbekannten Gründen, nicht immer. Ist sie noch giftig, wovon man sich jetzt durch einen besonderen Versuch überzeugen muß, so engt man sie mit Hilfe des in Bd. I, S. 162 und 163 dieses Werkes geschilderten Apparates ein, und zwar bei 22—23°; nach 6—8 Stunden ist das Wasser verjagt (ist die Außenluft feucht, so dauert es länger). Man nimmt den Rückstand jetzt mit möglichst wenig Wasser auf, filtriert und läßt das Filtrat im Vakuumexsikkator eintrocknen. Jetzt wird Alkohol zugegeben, vom ungelöst bleibenden abgesaugt und das alkoholische Filtrat tropfenweise mit in Alkohol gelöster konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nach 12—18 Stunden hat sich ein feiner Anflug von teils kristallinischer, teils amorpher Beschaffenheit gebildet. Die klare alkoholische Lösung wird dann abgegossen und nochmals wenig alkoholische Schwefelsäure zugesetzt. Diese zweite Fällung, scheinbar amorph, wird beim Stehen bald kristallinisch und enthält in der Regel die Hauptmenge des Sepsinsulfates. Durch vorsichtigen Zusatz von Äther kann man dann unter Umständen noch weitere Mengen dieses Salzes gewinnen. — Das Sepsinsulfat wird durch Lösen in Wasser und Wiederausfällen mit Alkohol gereinigt und stellt feine Nadeln von $^1/_2$—$^3/_4$ *cm* Länge vor.

Aus 5 *kg* Preßhefe wurden 0·03 *g* Sepsinsulfat erhalten, doch lieferten eine Reihe von Versuchen überhaupt keine Ausbeute an Substanz.

$C_5 H_{14} N_2$. Es sind folgende 4 verschiedenen Basen mit dieser Formel beschrieben.

1. Pentamethylendiamin. (Kadaverin, 1,5-Diaminopentan, $NH_2 . CH_2 CH_2 . CH_2 . CH_2 CH_2 NH_2$.) Die Base bildet eine farblose, sirupdicke, in Wasser und Alkohol leicht, in Äther schwer lösliche Flüssigkeit von penetrantem Geruch nach Piperidin und Sperma. Spez. Gew. 0·9174 bei 0°; Siedepunkt 175—178°. In Berührung mit Luft bildet die Base Nebel und zieht daraus Kohlensäure an. Die Identität der als Ptomain vorkommenden Base Kadaverin mit dem synthetischen Pentamethylendiamin wurde von *Ladenburg* und *Bocklisch* durch Überführung derselben in Piperidin erwiesen. Es bildet gut kristallisierende Salze.

Chlorhydrat, $C_5 H_{14} N_2 . 2 HCl$, kristallisiert in farblosen Prismen. Es ist in absolutem Alkohol schwer löslich, in 97%igem aber leicht löslich, was zur Trennung von dem in 97%igen Alkohol schwer löslichen Tetramethylendiaminchlorid dient. *Brieger* gibt an, das Pentamethylendiaminchlorid sei an der Luft zerfließlich, *Gulewitsch*[1]) bestreitet dies, ich aber sah den Körper nach längerem unbedeckten Stehen im Laboratorium zerfließen. Ich glaube, daß der wechselnde Feuchtigkeitsgehalt der Luft an der Verschiedenheit dieser Angaben Schuld ist und möchte auf das ganze Phänomen überhaupt keinen Wert legen. Das Chlorid zerfällt bei der trockenen Destillation in Ammoniak, Salzsäure und Piperidin.

[1]) *Gulewitsch*, Über Kadaverin und Cholin aus faulem Pferdefleisch. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20. S. 287 (1895).

Das Platindoppelsalz, $C_5 H_{14} N_2 . 2 HCl . Pt Cl_4$, entsteht in der Lösung des salzsauren Salzes auf Zusatz von alkoholischer Platinchloridlösung als gelber Niederschlag; es ist in 70·8 Teilen Wasser bei 21° löslich, kristallisiert aus Wasser in Prismen oder Nadeln und schmilzt bei etwa 215°.

Platinsulfocyanat, $C_5 H_{14} N_2 (HCNS)_2 . Pt . (CNS)_4$, kristallisiert in schönen langen Nadeln oder kurzen Prismen von orangegelber Farbe, die bei 160° anfangen sich zu bräunen und bei 176° sich schwärzen, ohne jedoch zu schmelzen; es ist löslich in warmem Wasser und in Alkohol, unlöslich in Äther.

Chloraurat, $C_5 H_{14} N_2 . 2 HCl . 2 Au Cl_3$, bildet in Wasser nicht allzu schwer lösliche Prismen vom Schmelzpunkt 186—188°.

Oxalat, $C_5 H_{14} N_2 . C_2 H_2 O_4 + 2 H_2O$, kristallisiert aus siedendem Alkohol in Nadeln, welche bei 160° unter Gasentwicklung schmelzen. Das saure Oxalat, $C_5 H_{14} N_2 . 2 C_2 H_2 O_4 + H_2 O$, kristallisiert aus verdünntem siedenden Alkohol in quadratischen bei 143° unter Zersetzung schmelzenden Tafeln; es ist, wie das neutrale Salz, in absolutem Alkohol und Äther unlöslich.

Quecksilberchloriddoppelsalze werden zwei gebildet, $C_5 H_{14} N_2 . 2 HCl . 3 Hg Cl_2$ und $C_5 H_{14} N_2 . 2 HCl . 4 Hg Cl_2$, von denen das letztere aus siedendem Wasser in bei 216° schmelzenden und in 32·5 Teilen Wassers von 21° löslichen Nadeln oder Blättchen kristallisiert. Dieses Salz verliert beim Erhitzen schon von 95° an Quecksilberchlorid.

Diacetylderivat, $C_5 H_{10} (NH CO CH_3)_2$, entsteht durch Erhitzen der Base mit Essigsäureanhydrid. Es kristallisiert aus siedendem Alkohol in kleinen Nadeln und destilliert oberhalb 360°, ohne Zersetzung zu erleiden.

Das Pentamethylendiamin reagiert schon in der Kälte mit Cyanessigsäureester, wobei ein Dicyanacetylderivat entsteht, $C_5 H_{12} N_2 (CN CH_2 CO)_2$, das farblose, bei 134—136° schmelzende Kristalle bildet.

Dibenzoylverbindung, $C_5 H_{10} (NH . CO . C_6 H_5)_2$, schmilzt bei 130°. Hierüber und über das Diphenyldicyanatpentamethylendiamin vgl. den Abschnitt über Harnbasen. Die Dibenzoylverbindung ist unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, aber aus dieser Lösung durch Äther nicht fällbar und schmilzt bei 130°. Sie ist widerstandsfähig gegen starke Alkalien und Säuren und wird erst durch anhaltendes Kochen ihrer alkoholischen Lösung mit starker Salzsäure in Benzoesäure und salzsaures Pentamethylendiamin gespalten.

Pikrat, $C_5 H_{14} N_2 2 (C_6 H_2 [NO_2]_3 . OH)$, ist in Wasser sehr wenig löslich, kristallisiert in dünnen Nadeln oder langgestreckten Tafeln und schmilzt bei 221° unter Schwärzung.

Pikrolonat, $C_5 H_{14} N_2 . 2 C_{10} H_8 N_4 O_5$, orangegelbe Nadeln und Täfelchen, in Wasser und Alkohol schwer löslich, aber löslicher als Putrescinpikrolonat; es zersetzt sich bei 250°.

Das Pentamethylendiamin wurde aufgefunden in gefaultem Fleisch von Pferden, in faulen Fischen, menschlichen Leichen, Cholerakulturen, gefaultem Eiweiß und Blut und Kulturen des *Finkler-Prior*schen Bazillus[1].

[1]) *Brieger*, Ptomaine. II, III. — *Bocklisch*, Über Fäulnisbasen (Ptomaine) aus Fischen. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 18. S. 1924 (1885). — *Finkler* und *Prior*,

in Tetanuskulturen[1]), im Emmentaler Käse[2]), in frischem Pankreas[3]), aus Pankreasautolyse, bei der die Fäulnis ferngehalten wurde[4]), aus Autolyse von Schweinemagen[5]), aus peptischer Verdauung von Ovalbumin[6]), aus gefaultem Lysin[7]), bei Destillation von Lysin[8]), im Harn von Cystinurikern[9]), in den Fäzes eines Patienten mit Dysenterie und Malaria.[10])

Die Entstehung des Pentamethylendiamins bei der Fäulnis aus Lysin ist sicher erwiesen.[11]) Die Base ist ungiftig.

2. **Neuridin**, $C_5H_{14}N_2$, soll eine unangenehm riechende gelatinöse Base darstellen, die in Wasser leicht löslich ist, sich aber in Alkohol und Äther nicht löst. Beim Kochen mit Natronlauge sah *Brieger* die Base in Di- und Trimethylamin zerfallen; die Isonitrilreaktion konnte er damit nicht erhalten, so daß er zu dem Resultat kommt, das Neuridin sei keine primäre, sondern eine tertiäre Ammoniumbase und müsse in irgend einer Beziehung zum Neurin stehen: dies suchte er durch den Namen Neuridin anzudeuten.

Chlorhydrat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl$, bildet in absolutem Alkohol, Äther und Amylalkohol unlösliche Nadeln. In nicht ganz reinem Zustande wird es jedoch von den letztgenannten Lösungsmitteln mehr oder minder aufgenommen.

Über Ptomaine aus Reinkulturen von Vibrio Proteus. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Bd. **20**. S. 1441 (1887).

[1]) *Brieger*, Zur Kenntnis der Ätiologie des Wundstarrkrampfes, nebst Bemerkungen über das Cholerarot. Deutsch. med. Wochenschr. S. 303 (1887).

[2]) *Winterstein* und *Thöny*, Beiträge zur Kenntnis der Bestandteile des Emmentaler Käses. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 28 (1902).

[3]) *Werigo*, Über das Vorkommen des Pentamethylendiamins in Pankreasinfusen. *Pflügers* Arch. Bd. **51**. S. 362 (1892).

[4]) *Emerson*, Über das Auftreten von Oxyphenylaethylamin bei Pankreasverdauung und über fermentative CO_2-Abspaltung. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **1**. S. 506 (1902). — *Magnus-Levy*, Über die Säurebildung bei der Autolyse der Leber. Ebenda. Bd. **2**. S. 288 (Fußnote) (1902). — *Kutscher* und *Lohmann* (Die Endprodukte der Pankreasselbstverdauung. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **41**. S. 332 [1904]) fanden das Pentamethylendiamin und Putrescin bei Pankreasselbstverdauung nicht; ihnen schließt sich der Befund *E. Abderhaldens* an (Lehrb. d. physiol. Chem. S. 353 [2. Aufl. 1909]), welcher unter sorgfältiger Ausschaltung von Bakterien unter der Wirkung reinen Pankreas- und Magensaftes kein Diamin fand.

[5]) *Lawrow*, Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 312 (1901).

[6]) *Langstein*, Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **2**. S. 229 (1902).

[7]) *Ellinger*, Die Konstitution des Ornithins und des Lysins. Zugleich ein Beitrag zur Chemie der Eiweißfäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 334 (1900).

[8]) *Neuberg*, Zur Kenntnis der Diamine. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 118 (1905).

[9]) *Baumann* und *v. Udransky*, Das Benzoylchlorid als Reagens. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **21**. S. 2744 (1888). — Dieselben, Über das Vorkommen von Diaminen, sog. Ptomainen bei Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **13**. S. 562 (1889). — *Löwy* und *Neuberg*, Über Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **43**. S. 338 (1904—1905).

[10]) *Roos*, Über das Vorkommen von Diaminen bei Krankheiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **16**. S. 192 (1892).

[11]) *A. Ellinger*, loc. cit. — *D. Ackermann*, Über die Entstehung von Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 482 (1909).

Pikrat, $C_5H_{14}N_2(C_6H_2[NO_2]_3OH)_2$, besonders schwer löslich in kaltem Wasser, nach *Brieger* sehr geeignet zur Trennung des Neuridins vom Cholin, welch letzteres ein leicht lösliches Pikrat liefert. Hat keinen Schmelzpunkt, bei 230° beginnt es, sich unter Ausstoßung gelber Dämpfe zu bräunen und verkohlt bei 250° gänzlich.

Chloraurat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl . 2AuCl_3$, in Wasser schwer löslich.

Chlorplatinat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl . PtCl_4$, kristallisiert in schönen, in Wasser löslichen Nadeln, aus der wässerigen Lösung wird es durch Alkohol ausgefällt.

Methode zur Gewinnung des Neuridins.

Das beste Ausgangsmaterial für die Darstellung des Neuridins ist nach *Brieger* fauler Leim.[1]) 2 *kg* gewöhnlichen Tischlerleims, in 5 *l* Wasser unter Zusatz von etwas Schlemmkreide gelöst, werden mit einigen Tropfen in hochgradige Fäulnis übergegangenen Eiweißes infiziert und 10 Tage lang einer Temperatur von 35° C ausgesetzt. Die Fäulnis ist nach Ablauf dieses Termines sehr weit vorgeschritten und der größte Teil des Leimes durch den Fäulnisprozeß absorbiert. Das Gemenge wird nun mit Salzsäure schwach angesäuert, auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand wiederholt mit Alkohol erschöpft. Die mehrmals durch Eindampfen und Wiederaufnahme mit Alkohol von anorganischen Bestandteilen und unzersetztem Leim befreiten Auszüge werden nun durch Kochen mit Tierkohle von harzigen und gefärbten Beimengungen getrennt und darauf in Alkohol gelöst. Die durch Platinchlorid in diesem gereinigten alkoholischen Auszuge erzielten Niederschläge werden wiederholt aus heißem Wasser umkristallisiert, worauf man zu dem in prachtvollen Warzen anschießenden Platinat des Neuridins gelangt; in den Mutterlaugen desselben findet man das Platinat der Base $C_2H_8N_2$.

Außer in faulem Leim fand *Brieger* das Neuridin noch unter den Fäulnisprodukten mancher anderer Stoffe, wie Fleisch[2]), Dorsch[3]), Kuhkäse[4]), Eigelb[5]), Barsch[6]), Reinkulturen von Typhusbazillen, menschliche Eingeweide, wie Lunge, Milz, Niere, Herz, Leber.[7]) Das Neuridin ist außer von *Ehrenberg*[8]), der es in vergifteter Wurst gefunden haben will, von niemandem wieder beobachtet. *Gulewitsch*[9]) suchte es vergebens in ganz frischem Gehirn. Das Neuridin ist ungiftig.

[1]) *Brieger*, Ptomaine. Bd. **1**. S. 53.

[2]) Ptomaine. Bd. **1**. S. 57.

[3]) Ptomaine. Bd. **1**. S. 43.

[4]) Ptomaine. Bd. **1**. S. 51.

[5]) Ptomaine. Bd. **1**. S. 58.

[6]) Ptomaine. Bd. **3**. S. 44.

[7]) Ptomaine. Bd. **2**. S. 17 und folgende Seiten.

[8]) *Ehrenberg*, Über einige in einem Falle von sog. „Wurstvergiftung" aus dem schädlichen Materiale dargestellte Fäulnisbasen sowie über einige durch die Tätigkeit eines besonderen, im gleichen Materiale aufgefundenen Bazillus gebildete Zersetzungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **11**. S. 239 (1887).

[9]) *Gulewitsch*, Über Leukomaine des Ochsengehirns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **27**. S. 50 (1899).

3. Saprin, $C_5H_{14}N_2$, wurde nur einmal von *Brieger* aus gefaulten menschlichen Organen[1]) dargestellt. Der Unterschied dieser Base vom Pentamethylendiamin besteht nach *Brieger* erstens in der großen Löslichkeit des Saprinplatinates in Wasser, ferner soll das Saprinplatinat parallel aggregierte spießige Kristalloide bilden, im Gegensatz zu der Rhombenform des Kadaverinplatinates. Auch soll das Saprin mit Goldchlorid gar keine Fällung geben, während das Pentamethylendiamin mit diesem Fällungsmittel ein, wenn auch ziemlich leicht lösliches Goldsalz liefert. Das Saprin ist ungiftig.

4. Gerontin, $C_5H_{14}N_2$. Diese mit Kadaverin isomere Base wurde von *V. Grandis*[2]) in den Leberzellen alter Hunde aufgefunden und von ihm in den Laboratorien von *Guareschi* und *Mosso* untersucht. Das Gerontin bildet eine dickflüssige alkalische Flüssigkeit von eigentümlichem Geruch, es gibt sämtliche allgemeine Reaktionen der Alkaloide. Längere Zeit sich selbst überlassen, verharzt es.

Chlorhydrat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl$, bildet kleine, rektanguläre Prismen.

Chlorplatinat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl . PtCl_4$, dicke, nadelförmige Kristalle.

Der Arbeit von *Grandis* entnehmen wir nachstehende Zusammenfassung der Hauptdaten (s. Tabelle I und II), welche zurzeit über die bis jetzt bekannten Basen der Formel $C_5H_{14}N_2$ ermittelt sind; den vier oben besprochenen ist hier noch das synthetisch gewonnene Methyltetramethylendiamin hinzugefügt.

Es scheint mir hier der Ort dafür, darauf hinzuweisen, daß doch möglicherweise die oben geschilderten Basen Neuridin, Saprin und Gerontin mit dem Pentamethylendiamin identisch sind; es spricht so manches für diese Annahme: wenn auch die genannten Körper sich in einer Reihe qualitativer Reaktionen und in den Eigenschaften mancher ihrer Salze verschieden verhalten sollen, so ist doch die Übereinstimmung in manchen wesentlichen Punkten eine nicht unerhebliche. Was das Neuridin angeht, so ist es auffällig, daß dieser Körper in den ersten Mitteilungen *Briegers* sehr regelmäßig genannt wird als ein Produkt von Fäulnismassen der verschiedensten Herkunft, das Kadaverin aber, dessen Allgegenwart in Flüssigkeiten, die gefaultes Eiweiß enthalten, doch jetzt bekannt ist, fast nie neben dem Neuridin aufgeführt wird. Erst später, als *Brieger* einen neuen Körper der Formel $C_5H_{14}N_2$ im Kadaverin entdeckt zu haben glaubt, findet sich dasselbe immer regelmäßiger. Man kann sich dieses Mißverhältnis mit *Briegers* Angabe erklären, daß das Neuridin am 5.—6. Tage der Fäulnis am reichlichsten auftrete, am 8. Tage aber gewöhnlich schon verschwunden sei, und in der Tat dauerte die Fäulnis bei den späteren Versuchen *Briegers* viel länger, als bei den ersten; indessen einfacher ist die Annahme, daß beide Körper identisch sind. Man wird einwenden, *Brieger* habe doch aus dem Neuridin Di- und Trimethylamin dargestellt und die Isonitritreaktion

[1]) Ptomaine, Bd. 2, S. 46.

[2]) *V. Grandis,* Sulla composizione della base che si trova cristallisata dentro il nucleo delle cellule epatiche. Rend. della R. Acc. dei Lincei 6, p. 230 (1890).

Tabelle I.

	Kadaverin	Saprin	Methyl-Tetramethylendiamin	Gerontin	Neuridin
Freie Base	Klare, farblose, sirupdicke Flüssigkeit. Raucht an der Luft, zieht daraus CO_2 an und kristallisiert dabei. — Riecht nach Sperma	Unverändert destillierbare Flüssigkeit, riecht schwach pyridinartig	Flüssigkeit. Raucht an der Luft und nimmt daraus CO_2 auf	Gelbliche, sirupdicke Flüssigkeit von unangenehmem spezifischen Geruch. Bei längerer Aufbewahrung verharzend	—
Chlorhydrat	Gut ausgebildete Nadeln. Löslich in Wasser, Alkohol und Ätheralkohol. Unlöslich in absolutem Alkohol	Breite, nicht zerfließliche Prismen	Nur schwierig kristallisierender dickflüssiger Sirup	Kleine rechtwinklige und größere rhombische Prismen. Äußerst zerfließlich; löslich in Alkohol und in Ätheralkohol	Lange, an Harnstoff erinnernde Nadeln. Nicht unzersetzt sublimierbar. Sehr leicht löslich in Wasser. Unlöslich in absolutem Alkohol, Äther und Chloroform.
Chloroplatinat	Schwer löslich; zersetzt sich zwischen 235° u. 236°	Zugespitzte, nach Art der Raphiden in paralleler Anordnung zu Bündeln vereinigte Kristalle. Leicht löslich	Dünne Blättchen; nur wenig löslich in kaltem Wasser, leichter in heißem. Unlöslich in Alkohol und Äther; schwärzen sich bei 220°	Starke, spindelige, zu Rosetten vereinigte Nadeln. Sehr leicht löslich in Wasser. Unlöslich in Alkohol. Zersetzt sich bei 215°	Lösliche Oktaeder.
Chloraurat	Lösliche Prismen	Gibt kein Goldsalz	Enthält 1 Molekül Kristallwasser, welches bei 100° entweicht. Schmelzpunkt: wasserhaltig 115°; wasserfrei 191°	Gelbe, sehr leicht lösliche Prismen	Wenig löslich in Wasser.
Chlorhydrargyrat	Bildet 2 Salze: 1. Mit 3 $HgCl_2$, 2. mit 4 $HgCl_2$	—	Zugespitzte Prismen + 5 $HgCl_2$. Löslich in Wasser u. Alkohol	Starke, rechtwinklige Prismen und Würfel; enthält nur 1 Mol. $HgCl_2$ und 2 Mol. Kristallwasser. Zerfließlich, zersetzt sich oberhalb 100°	—
Kalium Platinsulfocyanat	Schöne gelbe Prismen	—	—	Große gelbe Körner	—
Benzoylderivat	Schmelzpunkt 130°	—	—	Rechtwinklige Prismen. Schmelzpunkt: 175—176°	—
Pikrat	Wenig lösliche gelbe Nadeln. Schmelzpunkt 221°	—	Zersetzt sich zwischen 150° und 160°	Gelbe, linsenförmige, sehr leicht lösliche Kristalle	Langsam sich bildende gelbe Nadeln.

Tabelle II.

Reagenzien	Neuridin	Kadaverin	Saprin	Gerontin.
Phosphorwolframsäure	Weißer, amorpher, im Überschuß löslicher Niederschlag	Weißer, im Überschuß löslicher Niederschlag	—	Weißer, korniger, in rechtwinkligen Prismen kristallisierender Niederschlag.
Phosphormolybdänsäure	Weißer, kristallinischer Niederschlag	Weißer, kristallinischer Niederschlag	—	Aus hexagonalen Kristallen bestehender gelber Niederschlag, dessen Farbe nach und nach in Grün und Blau übergeht.
Kalium-Wismutjodid	Roter, amorpher Niederschlag	Rote Nadeln	Amorpher Niederschlag	Rote, von Pyramiden begrenzte Prismen.
Jodkalium	0	Braune Nadeln	—	Gelber, amorpher Niederschlag.
Jod-Jodwasserstoffsäure	0	Braune Nadeln	—	—
Pikrinsäure	Langsam sich ausscheidender Niederschlag, der alsbald in schöne gelbe Nadeln übergeht	Gelbe Nadeln	—	Aus linsenförmigen, paarweise vereinigten Kristallen bestehender gelber Niederschlag.
Tannin	0	Weißer, amorpher Niederschlag	—	Weißer, sich bräunender amorpher Niederschlag.
Platinchlorid	—	Rhombische, schwer lösliche Kristalle	Zugespitzte, in paralleler Anordnung zu Bündeln vereinigte, leicht lösliche, kristalloide Gebilde	Große, spindelige, rosettenförmig vereinigte Nadeln.
Goldchlorid	Kristallinischer Niederschlag	Gut ausgebildete, leicht lösliche Nadeln	0	Gelber, aus sehr leicht loslichen Nadeln bestehender Niederschlag.
Quecksilberchlorid	0	—	—	Langsam sich ausscheidender, aus großen kubischen und prismatischen Kristallen bestehender Niederschlag.
Froehdes Reagens	—	—	—	Vorübergehende rosenrote Färbung.

nicht mit seiner Base erhalten, demgegenüber muß aber bemerkt werden, daß von ihm sowohl für das Kadaverin[1]) wie für das Putrescin[2]) Reaktionen angegeben worden sind, die mit der später ermittelten Konstitution dieser Körper nicht in Einklang gebracht werden können. Was das Saprin angeht, so ist es ebenso wie *Grandis'* Gerontin nur einmal gefunden worden. Jedenfalls möchte ich dringend empfehlen, nach Auffindung einer Base der Formel $C_5H_{14}N_2$ immer zuerst an Pentamethylendiamin zu denken, selbst wenn einige Reaktionen nicht dafür sprechen. Ist man geneigt, doch eine andere Base vorauszusetzen, so kann nur eine Konstitutionsermittlung Klarheit schaffen, und zwar ist es dann gewiß das beste, das Chlorid der Base trocken zu destillieren. Bekommt man dann in der Vorlage Piperidin, so handelt es sich nach *Ladenburg*[3]) doch um Pentamethylendiamin, im anderen Falle aber um ein Isomeres.

Ich lasse hier die Schilderung eines solchen Versuches folgen, den ich selbst einmal genötigt war, anzustellen[4]), in der Annahme, Neuridin in Händen zu haben, die sich aber nicht bestätigte.

6 *g* des in Frage stehenden Chlorides werden in einem Kölbchen der trockenen Destillation unterworfen und das sich an den kälteren Teilen des Gefäßes in Form von Öltropfen und Kristallen abscheidende Destillat näher untersucht. Man löst es zuerst in ziemlich viel Wasser, fällt sodann mit wässerigem Platinchlorid, worauf sich eine größere Menge Ammoniumplatinat abscheidet. Von dieser wird abfiltriert, in das Filtrat Schwefelwasserstoff eingeleitet und nochmals filtriert. Die so erhaltene Flüssigkeit engt man stark ein und kann daraus durch Zusatz von Goldchlorid mehrere Gramm Piperidinchloraurat gewinnen, wenn anders die untersuchte Base Pentamethylendiamin war.

Sollten sich die genannten Basen auf diese Weise doch alle als Pentamethylendiamin erweisen, so würde dadurch unseres Erachtens das große Verdienst, was sich *Brieger* um die Fäulnischemie erworben hat, kaum geschmälert, ist es doch eine alte Erfahrung, daß in der Alkaloidchemie Jahrzehnte hindurch ein und dieselbe Substanz unter verschiedenen Namen geführt wird, bis schließlich die Identität all dieser verschiedenen Körper sich herausstellt. So hat das Cholin beispielsweise früher auch noch die Namen Sinkalin, Bilineurin und Amanitin getragen.

$C_6H_{13}NO_3$ wurde aus faulem Fleisch gewonnen.[5])

Mydatoxin, $C_6H_{13}NO_2$. Aus 4 Monate altem Pferdefleisch und aus menschlichen Leichenteilen.[6]) Das Chlorid liefert, mit Silberoxyd versetzt,

---

[1]) *Brieger*, Ptomaine. Bd. 2. S. 41.

[2]) *Brieger*, Ptomaine. Bd. 2. S. 43 und Bd. 3. S. 103.

[3]) *Ladenburg*, Piperidin aus Pentamethylendiamin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 18. S. 3100 (1885).

[4]) *D. Ackermann*, Ein Beitrag zur Chemie der Fäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54. S. 19 (1907/08).

[5]) *J. Abelous, H. Ribaut, A. Soulié* und *G. Toujan*, Über das Vorkommen eines den arteriellen Blutdruck erhöhenden Ptomains in den Mazerationen gefaulter Muskeln. Compt. rend. soc. Biol. T. 59. p. 589 (1905).

[6]) *Brieger*, Ptomaine. III. p. 24 und 32.

einen alkalisch reagierenden Sirup, der sich bei der Destillation zersetzt. Weiße Mäuse sind sehr empfindlich dagegen, doch ist es sonst kein kräftiges Gift. Liefert ein in Wasser ziemlich leicht lösliches Platinat, $C_6H_{13}NO_2 . 2HCl . PtCl_4$, vom Schmelzpunkt 193°, doch mit Goldchlorid angeblich überhaupt keine Fällung. Das Quecksilberdoppelsalz ist leicht löslich. — Übrigens fand *Brieger* gelegentlich der Untersuchung eines alten Tetaninpräparates eine physiologisch ganz indifferente Base der Formel $C_6H_{13}NO_2$, dessen in Wasser und Spiritus leicht lösliches Platinat bei 197° schmolz. Es zeigte wesentliche Differenzen vom Leucin, mit dem es prozentisch gleich zusammengesetzt ist. Auch ist es möglich, daß *E.* und *H. Salkowski*[1]) diesen Körper schon in der Hand hatten, wenigstens findet sich unter ihren Fäulnisbasen eine solche mit dem Platinwert des Mydatoxins. Die Darstellung des Mydatoxins siehe auf Seite 1006.

Hexylamin, $C_6H_{15}N$. Aus fauler Bierhefe[2]), aus Lebertran.[3]) Die Darstellung siehe auf Seite 1043.

Hexamethylendiamin, $C_6H_{16}N_2$. Dieser Körper ist dargestellt von *A. Garcia*[4]) und als Platinat und Benzolylverbindung untersucht. Die gefundenen Differenzen zwischen der von ihm entdeckten Base und dem Pentamethylendiamin begründen sich auf der Verschiedenheit des Schmelzpunktes der Benzoylverbindungen, den Gehalt an Kohlenstoff und Stickstoff und der Verschiedenheit im Aussehen der Kristalle der Platindoppelsalze; dagegen haben Kristallmessungen der beiden Platinate keinen Unterschied ergeben. — Wahrscheinlich existiert der Körper doch nicht und ist nur ein verunreinigtes Pentamethylendiamin oder Tetramethylendiamin. Auch ich glaubte ihn einmal auf Grund eines dazu stimmenden Platinwertes, der sich trotz häufigem Umkristallisieren nicht ändern wollte, in Händen zu haben, nach der Überführung der Verbindung in das Goldsalz aber zeigte sich doch, daß ich es mit Tetramethylendiamin zu tun hatte.

C_7H_9NO von *Gautier* dargestellt aus fauler Leber vom Kabeljau.[5]) Die Darstellung siehe bei der des p-Hydroxyphenylaethylamins und der „Tyrosinamine“ nach *Gautier*.

$C_7H_{15}NO_2$, unbenannte Base von *E.* und *H. Salkowski*[1]) aus faulem Fibrin gewonnen. Ihre Darstellung ist wie die der δ-Aminovaleriansäure.

Gadinin, $C_7H_{17}NO_2$, zuerst gefunden im faulen Dorsch (Gadus callarias)[6]) und aus gefaultem Leim, aus faulen Heringen durch Destil-

[1]) *E.* und *H. Salkowski*, Über basische Fäulnisprodukte. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **16**. S. 1195 (1883).

[2]) *Hesse*, Jahresber. über d. Fortschr. d. Chem. S. 403 (1857).

[3]) *Gautier* und *Mourgues*, Über die Alkaloide aus Lebertran. Compt. rend. T. **107**. p. 110 (1888).

[4]) *A. Garcia*, Über Ptomaine, welche bei der Fäulnis von Pferdefleisch und Pankreas entstehen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **17**. S. 543 (1893).

[5]) *Gautier*, Sur les tyrosinamines. Bull de la soc. chim. de Paris (3). T. **35**. p. 1195 (1906).

[6]) *Brieger*, Ptomaine. I. S. 49.

lation[1]. (hier zeigte sich das Platinat leicht löslich), aus Reinkulturen von Proteus vulgaris auf Fleisch.[2])

Platinat, $(C_7H_{17}NO_2)\,2HCl.PtCl_4$, schwer löslich in Wasser, Schmelzpunkt 214°. Goldsalz nicht kristallisierend. Chlorid, dicke farblose Nadeln, in Alkohol unlöslich, in Wasser leicht löslich.

$C_7H_{17}NO_2$, unbenannte Base aus Fleischfäulnis.[3]) Das Chlorid fällt nicht mit Platinchlorid und nicht mit Pikrinsäure. In Wasser schwer lösliches Goldsalz vom Schmelzpunkt 176°. Die Darstellung siehe Seite 1005.

Typhotoxin, $C_7H_{17}NO_2$, aus Kulturen von Typhusbazillen auf Fleischbrei.[4]) Schwer lösliches Goldsalz, $(C_7H_{17}NO_2)_2\,2HCl.2AuCl_3$, in Prismen kristallisierend vom Schmelzpunkt 176°. Das Platinat bildet leicht lösliche Nadeln. Mit Pikrinsäure entsteht eine schwer lösliche Verbindung und das ist ein Grund, weswegen *Brieger* diese Base für nicht identisch mit der vorhergehenden aus Fleischfäulnis gewonnenen hält. Darzustellen als Platinat aus dem Quecksilberniederschlag.

$C_7H_{18}N_2O_6$, unbenannte Base, welche aus Fäulnisgemischen verschiedener Herkunft gewonnen wurde[5]), bildet Kristalle, die sich an der Luft braun färben und mit Platinchlorid ein kristallinisches Doppelsalz, das in Alkohol sich nicht löst.

Gewinnung der Basen $C_5H_{12}N_2O_4$ und $C_7H_{18}N_2O_6$ nach Pouchet.[6])

Man läßt Eiweißstoffe (Albumin, Casein, Leim, Fibrin) unter Luftabschluß faulen, stellt die Tannate der Alkaloide dar und zersetzt diese Verbindungen durch Bleihydroxyd in Gegenwart von starkem Alkohol, später nimmt man verdünnten Alkohol.

Die Verdunstung der alkoholischen Lösungen liefert eine sirupförmige Masse, welche man in den Dialysator bringt. Es gehen dann die gewünschten Basen in das Dialysat über und werden durch Zugabe von Salzsäure und Platinchlorid in die Platindoppelsalze verwandelt, die sich durch ihre verschiedene Löslichkeit in Alkohol trennen lassen. $(C_7H_{18}N_2O_6)_2.2HCl.PtCl_4$ bildet prismatische Nadeln und ist unlöslich in Alkohol. $(C_5H_{12}N_2O_4)_2.2HCl.PtCl_4$ ist löslich in Alkohol, läßt sich aus ihm aber durch Äther als gelbes Pulver niederschlagen.

$C_8H_{11}N$, unbenannte Base, aus faulem Oktopusfleisch dargestellt.[7]) Das Ausgangsmaterial, über 40 Tintenfische, wurde der Sepiabeutel beraubt,

[1]) *Bocklisch*, Über Fäulnisbasen (Ptomaine) aus Fischen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **18**. S. 1927 (1885).

[2]) *Carbone*, Über die von Proteus vulgaris erzeugten Gifte. Zentralbl. f. Bakt. Bd. **8**. S. 768 (1890).

[3]) *Brieger*, Ptomaine. Bd. **3**. S. 28.

[4]) *Brieger*, Ptomaine. Bd. 3. S. 86.

[5]) *Pouchet*, Recherches sur les ptomaines et composés analogues. Compt. rend. T. **97**. p. 1560 (1883).

[6]) Das Verfahren ist vom Verfasser selbst nur so kompendiös geschildert.

[7]) *Oechsner de Coninck*, Contribution à l'étude des ptomaines. Compt. rend. T. **106**. p. 858 u. 1605 (1888).

gewaschen und zwei bis drei Wochen an freier Luft faulen gelassen. Die Isolierung der Base geschah nach dem Verfahren von *Gautier*: sie riecht unangenehm, ist wenig löslich in Wasser, löslich in Äther, Alkohol und Aceton; siedet bei 202° ohne Zersetzung, wenn sie vorher über Kali getrocknet war. An der Luft bräunt sie sich und zieht begierig Wasser an. Das Chlorhydrat und Bromhydrat sind leicht löslich. Das Platinat ist ein dunkelorangefarbenes Pulver, fast unlöslich in kaltem, löslich in heißem Wasser. Mit warmem Wasser in Berührung, wandelt sich die Verbindung $(C_8H_{11}N.HCl)_2.PtCl_4$ um in $(C_8H_{11}NCl)_2PtCl_2$, ein hellbraunes Pulver, fast unlöslich in heißem Wasser. Das Chloraurat ist hellgelb, ziemlich beständig in der Kälte, sehr unbeständig in warmem Wasser; ein geringer Überschuß von Goldchlorid wird davon schon in der Kälte reduziert. Die Zugehörigkeit der Base zur Pyridingruppe wurde erwiesen durch Überführung der Base in Nikotinsäure durch Kaliumpermanganat.

Eine Base der gleichen Formel fand *Emmerling*[1]) in Fibrin, welches durch Streptokokken zersetzt war. Es stellte einen pyridinartig riechenden Sirup dar. Das Platinat war leicht löslich. Das Pikrat bildete Nadeln.

Gewinnung der Base $C_8H_{11}N$ und des Trimethylamins nach Emmerling.

4 *kg* feuchtes Fibrin werden nebst 3 *l* Wasser in geräumiger Flasche 4 Tage nacheinander je 2 Stunden bei 100° sterilisiert. Dann wird mit einer Reinkultur von Streptococcus longus *Petruschky* geimpft, die Luft aus der Flasche mit Wasserstoff verdrängt und 3 Wochen bei 40° belassen. — Nach dieser Zeit besteht der Flascheninhalt aus einer trüben gelblichen Flüssigkeit von käseartigem, aber nicht fauligem Geruch. Man muß jetzt durch ein *Pukall*sches Filter filtrieren, was 5 Tage erfordert und zu 4 *l* einer klaren Flüssigkeit führt, die im Vakuum bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur eingedampft wird. Nach einiger Zeit scheiden sich Kristalle von Tyrosin und Leucin aus, welche man absaugt, worauf man das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure ansäuert und ausäthert, um Säuren zu beseitigen. Der Äther wird dann der schwefelsauren Lösung wieder durch Abdunsten entzogen, diese dann mit Baryumchlorid von der Schwefelsäure befreit und im Vakuum zur Trockne eingedampft. — Jetzt wird nach *Briegers* Methode weiter gearbeitet. Den Rückstand extrahiert man mit Alkohol und fällt den alkoholischen Extrakt mit alkoholischem Bleiacetat, worauf das Filtrat des Bleiniederschlages nach dem Behandeln mit Schwefelwasserstoff mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung versetzt wird. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, in kochendem Wasser aufgenommen und von unlöslichen Eiweißquecksilberverbindungen abgesaugt. Dieses Filtrat wandelt man mit Hilfe von Schwefelwasserstoff in eine Lösung von Chloriden um, die man zum Sirup einengt und mit Alkohol aufnimmt. Es bleibt Salmiak zurück, während Trimethylaminchlorid in

[1]) *Emmerling*, Die Zersetzung von Fibrin durch Streptokokken. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **30**. S. 1863 (1897).

Lösung geht, das nach dem Abdampfen des Alkohols mit Goldchlorid gefällt und als Chloraurat identifiziert wird.

Aus dem Filtrat der Quecksilberfällung beseitigt man das Metall durch Schwefelsauerstoff, dampft ein und extrahiert den Rückstand mit Alkohol. Der alkoholische Auszug wird vom Alkohol durch Abdampfen befreit, mit Platinchlorid gefällt und im Exsikkator über Schwefelsäure langsam eingedunstet. Man erhält dann das Salz, $(C_8H_{11}N)_2 2HCl . PtCl_4$, als gelbrote Kristalle, welche mit wenig Alkohol gewaschen, auf Ton getrocknet werden.

Collidin, $C_8H_{11}N$, wurde nach fünftägiger Fäulnis aus einem Gemenge von Ochsenpankreas und Gelatine gewonnen.[1]) *Nencki* identifiziert das Collidin mit Phenyläthylamin, welches er aus dem Phenylalanin durch CO_2-Abspaltung sich entstanden denkt. — *Brieger* konnte es nicht wiedergewinnen.[2]) Unter dem Namen Protoconin wurde die Base bereits dargestellt von *Thudichum*.[3])

Phenyläthylamin wurde ferner bei der Leimfäulnis von *Jeanneret*[4]) entdeckt, im faulen Pferdefleische von *Barger* und *Walpole*.[5])

Phenyläthylamin ist ein Öl, das CO_2 anzieht und zu einer blätterigen Masse erstarrt. Das Platinat ist schwer löslich. Das Chlorid gibt nach *E. Schulze* in wässeriger Lösung mit Quecksilberchloridlösung eine kristallinische Fällung, die sich in Alkohol auflöst. — Die Darstellung des Phenyläthylamins nach *Barger* und *Walpole* ist beim Oxyphenyläthylamin geschildert.

Oechsner de Coninck[6]) gewann aus Collidin, wenn er es unter Lichtabschluß einige Wochen mit sehr verdünntem Wasserstoffsuperoxyd stehen ließ, das sogenannte Oxyptomain oder Collidon, eine gelbliche feste Masse, die in verdünnter Salzsäure löslich ist. Das Platinat stellt ein orangegelbes Pulver dar, bei 210° unter Zersetzung schmelzend, ist kaum löslich in kaltem Wasser. — Mit Zink unter Luftabschluß erhitzt, wird das Oxyptomain zu Collidin zurückverwandelt.

$C_8H_{13}N$. Diese als Hydrocollidin aufgefaßte Base wurde aus faulem Makrelen-, Pferde- und Rindfleisch von *Gautier* und *Étard*[7]) gewonnen.

---

[1]) *Nencki*, Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweiß bei der Fäulnis mit Pankreas. Bern 1876; ferner: Zur Geschichte der basischen Fäulnisprodukte. Journ. f. prakt. Chem. [2.] Bd. **26**. S. 47 (1882). — Derselbe, Untersuchungen über die Zersetzung des Eiweißes durch anaerobe Spaltpilze. Monatshefte f. Chem. Bd. **10**. S. 506 (1889).

[2]) *Brieger*, Ptomaine. Bd. **1**. S. 55.

[3]) *Thudichum*, Grundzüge der anatomischen und klinischen Chemie. Berlin. Hirschwald. S. 16. (1886).

[4]) *Jeanneret*, Untersuchungen über die Zersetzung von Gelatine und Eiweiß durch die geformten Pankreasfermente bei Luftabschluß. Journ. f. prakt. Chemie. Neue Folge. Bd. **15**. S. 353 (1877).

[5]) *Barger* und *Walpole*, Isolation of the pressor principles of putrid meat. Journ. of Physiol. Vol. **38**. p. 343 (1909).

[6]) *Oechsner de Coninck*, Über ein Oxyptomain. Compt. rend. T. **126**. p. 651 (1898) und Beitrag zum Studium eines Oxyptomains. Ibid. T. **129**. p. 109 (1899).

[7]) *Gautier* und *Étard*, Über den Mechanismus der fauligen Gärung und über die dabei gebildeten Alkaloide. Compt. rend. T. **94**. p. 1598 (1882) und Über die Produkte der Bakterienfäulnis der Albuminstoffe. Ibid. T. **97**. p. 264 (1883).

Farblose, ölige Flüssigkeit, die nach Holunder riecht. Die Base siedet bei 210° und zieht CO_2 aus der Luft an, wobei sie verharzt. Sie besitzt stark reduzierende Eigenschaften. Das Chlorid ist in Wasser und Alkohol löslich. Das Platinat zersetzt sich am Licht und beim Erwärmen, ist schwer löslich. Das Chloraurat ist leicht löslich und wird schnell reduziert. *Nencki* hielt diese Base für mit seinem Phenyläthylamin identisch.

Die Darstellung aus faulen Makrelen siehe bei der Base $C_9H_{13}N$.

Darstellung der Base $C_8H_{13}N$ nach Gautier und Étard.

Man läßt Rindfleisch mit Wasser aufgeschwemmt lange Zeit (bei den genannten Autoren war es ein Jahr) faulen, destilliert das Fäulnisgemisch bei niederer Temperatur im Vakuum ab und erschöpft den Rückstand mit Äther, dieser nimmt außer einer größeren Menge Fettsäuren die gesuchte Base auf. Man destilliert den Äther ab und erhält einen braunen, öligen Rückstand, aus welchem bald eine Fettsäure auskristallisiert; man saugt von dieser ab, gibt zu dem Filtrat verdünnte Schwefelsäure und schlägt auf diese Weise den Rest der Fettsäure nieder, während man die Base als Sulfat in Lösung hat. Diese abfiltrierte Lösung wird jetzt mit Kalilauge alkalisch gemacht und mit Äther geschüttelt, worauf man die ätherische Lösung der Base durch Abdampfen vom Äther befreit und nun mit Hilfe von Platinchlorid daraus das Platinat des Körpers gewinnt. — Bestand das Ausgangsmaterial in faulen Makrelen, so findet man im Filtrate dieser Platinfällung das Platinat des Scombrins.

Mydin, $C_8H_{11}NO$, wurde von *Brieger*, und zwar aus 4 Monate alten menschlichen Leichenteilen, gefaultem Pferdefleisch und Typhuskulturen gefunden.[1]) Die Base ist ungiftig, zersetzt sich beim Destillieren und besitzt ein starkes Reduktionsvermögen, so daß sie aus Goldchloridlösung metallisches Gold niederschlägt. Die einzig handliche Verbindung ist das Pikrat, $C_8H_{11}NO \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$, welches bei 195° schmilzt.

Darstellung des Mydins nach Brieger.

Dasselbe findet sich im Filtrate des nach *Briegers* Methode hergestellten Quecksilberniederschlages. Man beseitigt aus diesem Filtrat das Metall durch H_2S und schlägt daraus mit Phosphormolybdänsäure ein Harz nieder, nach dessen Zerlegung mit Bleiacetat ein in farblosen Blättchen kristallisierendes Chlorhydrat resultiert; man identifiziert es als Pikrat.

p-Hydroxyphenyläthylamin, $C_8H_{11}NO$. Wurde gewonnen aus fauler Leber des Kabeljau[2]), aus Emmentaler Käse[3]), aus einer Pankreas-

[1]) *Brieger*, Ptomaine. III. S. 26.

[2]) *Gautier*, Sur les tyrosinamines. Bull. soc. chim. de Paris. [3.] T. 35. p. 1195 (1906).

[3]) *Winterstein* und *Küng*, Über das Auftreten von p-Oxyphenyläthylamin im Emmentaler Käse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59. S. 138 (1909).

selbstverdauung mit Toluol[1], aus peptischer Verdauung von Eiweiß[2], aus gefaulter Plazenta[3], aus faulem Pferdefleisch[4], aus Pankreasfäulnis.[5] Es ist so gut wie sicher, daß der Körper aus Tyrosin durch CO_2-Abspaltung unter der Wirkung der Fäulnisbakterien entsteht (*Winterstein* und *Küng*, *Barger* und *Walpole*). *Winterstein* und *Küng* sowie ich erhielten den Körper als Platinat. Das Chlorid gibt die *Millon*sche Reaktion und liefert auf Zusatz von Bromwasser eine gelbliche Färbung.

Darstellung des p-Hydroxyphenyläthylamins und der beiden anderen „Tyrosinamine" (C_7H_9NO und $C_9H_{13}NO$) nach Gautier.

Die von faulen Lebern des Kabeljaus restierenden Flüssigkeiten werden stark eingeengt und mit Kalilauge versetzt, worauf ein Öl entsteht, das an der Oberfläche schwimmt. Dieses trennt man ab, wäscht es mit Äther, wodurch Amylamin und andere Körper abgetrennt werden, und behandelt nun den in Äther unlöslichen Rückstand mit Amylalkohol, welcher die gewünschten Basen aufnimmt. — In den amylalkoholischen Extrakt wird jetzt Kohlensäure geleitet, vom ausgeschiedenen Kaliumkarbonat abfiltriert und das Filtrat mit sehr verdünnter Schwefelsäure versetzt; man filtriert das gebildete Kaliumsulfat ab und beseitigt aus dem Filtrat die Schwefelsäure mit Barytwasser. — Jetzt braucht man nur im Vakuum einzuengen und erhält beim Abkühlen die drei Basen in Nadeln und Blättchen kristallisiert. Sie werden durch fraktionierte Kristallisation getrennt.

Methode von Barger und Walpole zur Isolierung von p-Hydroxyphenyläthylamin, Phenyläthylamin und Isoamylamin.

Frisches Pferdefleisch wird in Portionen von jedesmal 10 *kg* in verschlossenen Flaschen ohne weitere Hinzufügung von Wasser mit etwas Fäulnisflüssigkeit geimpft 6—8 Tage bei 37° stehen gelassen. Nach dieser Zeit ist die Masse teilweise verflüssigt, die Flaschen werden nach Zugabe von etwas Salzsäure im Dampftopf auf 100° erwärmt, so daß die Eiweißkörper koagulieren. Jetzt filtriert man im Freien ab und engt das Filtrat im Vakuum unter Benutzung eines Schwefelsäureverschlusses ein, welcher das Übertreten unangenehmer Gerüche in die Außenluft völlig verhindert.

---

[1]) *Emerson*, Über das Auftreten von p-Oxyphenyläthylamin bei Pankreasverdauung und über fermentative CO_2-Abspaltung. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **1**. S. 501 (1902).

[2]) *Langstein*, Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **1**. S. 514 (1902).

[3]) *Rosenheim*, The pressor principles of placental extracts. Journ. of Physiol. Vol. **38**. p. 337 (1909).

[4]) *Barger* and *Walpole*, Isolation of the pressor principles of putrid meat. Journ. of Physiol. Vol. **38**. p. 343 (1909).

[5]) *D. Ackermann*, Über die Entstehung von Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 482 (1909).

Der so erhaltene Sirup wird gut mit Sand angerieben und dann mit Aceton extrahiert, in welches die gewünschten Basen als Chloride übergehen, Eiweißkörper aber nicht aufgenommen werden. Nach dem Verdampfen des Acetons aus dem Acetonextrakt bleibt eine dunkelbraune Flüssigkeit, welche noch ziemliche Mengen Fettsäuren enthält. Man mischt dieselbe mit Chloroform gut durch und extrahiert nun diese Chloroformlösung mit verdünnter Salzsäure. Dadurch bekommt man die Basen als Chloride in das salzsaure Wasser hinein, während die Fettsäuren und Farbstoffe im Chloroform bleiben.

Nachdem man die saure Basenlösung mit Chloroform nochmals gewaschen hat, macht man sie alkalisch und extrahiert sie jetzt mit Äther, trocknet die ätherische Lösung mit Natriumsulfat und fällt dann mit einer ätherischen Lösung von wasserfreier Oxalsäure. Der Niederschlag, welchen man aus Alkohol und Aceton umkristallisiert, besteht aus dem sauren, bei 169° schmelzenden Oxalat des Isoamylamins ($C_5H_{13}N . C_2H_2O_4$)[1], aus dem man durch Zusatz von Kalk die charakteristisch riechende Base vom Siedepunkt 95° freimachen kann. — Diese kann man durch Zugabe von alkoholischer Bromwasserstoffsäure zur ätherischen Lösung der Base in das Hydrobromid überführen, welches glänzende Platten vom Schmelzpunkt 225° liefert und in Wasser sehr leicht löslich ist.

Wenn man neben Isoamylamin die beiden anderen Basen gewinnen will, destilliert man aus der anfänglichen sauren Lösung der Basen nach dem Waschen mit Chloroform bei natronalkalischer Reaktion im Wasserdampfstrom das Isoamylamin über; aus dem mit Natronhydrat alkalisch gemachten Destillationsrückstand extrahiert man durch Schütteln mit Amylalkohol die neutralen Substanzen und Phenyläthylamin, trennt den Amylalkohol durch Abdampfen von den in ihn eingegangenen Substanzen und löst den dunkelbraunen Rückstand in Chloroform, um diese Lösung dann mit verdünnter Salzsäure auszuschütteln. Die salzsaure Basenflüssigkeit wird alkalisch gemacht und ihr die Base jetzt durch Äther entzogen. Diesen trocknet man, dampft ihn ab und destilliert den Rückstand, wobei man den bei 190—210° übergehenden Teil gesondert auffängt: er enthält das Phenyläthylamin, welches bei 198° siedet und durch Zugabe von alkoholischer Salzsäure als kristallinisches Chlorid gewonnen werden kann. (Hatte man die anfängliche Wasserdampfdestillation fortgelassen, so geht vor dem Phenyläthylamin das schon bei 95° siedende Isoamylamin über.)

Das p-Hydroxyphenyläthylamin erhält man aus derjenigen Flüssigkeit, welche bei natronalkalischer Reaktion mit Amylalkohol vom Phenyläthylamin befreit war, indem man sie ansäuert und dann nicht mit Natron, sondern mit Soda alkalisch macht, denn da das p-Hydroxyphenyläthylamin eine Phenolbase ist, wird sie sowohl von einer natronalkalischen wie von einer sauren Lösung festgehalten und läßt sich nur bei sodaalkalischer

[1]) Diese Verbindung zersetzt sich bei 100° und kann nur im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet werden.

Reaktion extrahieren. Man schüttelt jetzt mit Amylalkohol, befreit den amylalkoholischen Extrakt durch Abdampfen im Vakuum vom Amylalkohol und reinigt die zurückgebliebene Base als Benzoylderivat. Das Dibenzoyl-p-hydrooxyphenyläthylamin, das sich aus Alkohol umkristallisieren läßt, schmilzt bei 170°.

Viridinin, $C_8H_{12}N_2O_3$, aus gefaultem Pankreas nach *Ackermanns* und *Kutschers* Methode dargestellt [1]), findet sich in derselben Fraktion wie die δ-Aminovaleriansäure, von der es durch die viel geringere Löslichkeit seines Platin- und seines Goldsalzes leicht zu trennen ist. Das Platinat, $(C_8H_{12}N_2O_3)_2H_2PtCl_6$, ist intensiv gelb, wie ein Goldsalz gefärbt, bildet feine, stäubende Nädelchen, die sich ungefähr zwischen 212° und 216° schwärzen. Das Aurat, $C_8H_{12}N_2O_3 . HCl . AuCl_3$, bildet schwarzbraune feine Kristallnadeln, die sich in heißem Wasser leicht, in kaltem schwer lösen und bei 176° unter Aufschäumen schmelzen. Bei den Salzen geht nur ein N-Atom eine Bindung ein. Das Chlorid besteht merkwürdigerweise aus glänzenden Nadeln von schöner grüner Farbe. Über seine Darstellung siehe die Methode von *Ackermann* und *Kutscher,* Seite 1010.

$C_3H_{14}N_4O_8$, unbenannte Base, aus Schweinefleischbouillon mit dem *Salomon*schen Bazillus der Schweinecholera gewonnen von *Fred. G. Novy.* [2]) Als Platinat, nach *Briegers* Verfahren isoliert, und zwar aus dem in alkoholischer Lösung erhaltenen amorphen Quecksilberniederschlag.

Marcitin, $C_8H_{19}N_3$, wurde von *Ackermann* [3]) aus faulem Pankreas dargestellt. Seine Darstellung ist oben gelegentlich der Schilderung des Verfahrens von *Ackermann* und *Kutscher* Seite 1009 angegeben. Es wurde bisher nur das Goldsalz, $C_8H_{19}N_3 . 2HCl . 2AuCl_3$, dargestellt, welches zwischen 175 und 178° unter Aufschäumen schmilzt und sehr schwer völlig verbrennt. Der Gehalt an 3 Atomen N läßt an ein Guanidinderivat denken.

$C_9H_9N_5O_8$ aus Pankreasfäulnis [4]) einmal gewonnen und nur als Pikrat analysiert. Die Darstellung siehe beim Verfahren nach *Ackermann* und *Kutscher,* Seite 1008.

$C_9H_{13}N$, eine Base, die von *Gautier* und *Étard* [5]) aus faulen Makrelen und faulem Pferdefleisch erhalten wurde. Bildet eine bernsteinfarbene, nach Weißdorn riechende, in Wasser nur wenig lösliche Flüssigkeit, welche an der Luft unter Dunkelfärbung verharzt. Das Chloraurat ist sehr leicht löslich: das schwerlösliche Platinat zersetzt sich an der Luft. Ob die Base,

[1]) *D. Ackermann,* Über eine Base aus gefaultem Pankreas. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 57. S. 28 (1908).

[2]) *Fred. G. Novy,* Die toxischen Produkte des Bacillus der Schweinecholera. Medical News. Sept. 1890. pag. 23.

[3]) *Ackermann,* Ein Beitrag zur Chemie der Fäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54. S. 1 (1907/08).

[4]) *Ackermann* und *Mey,* Untersuchung eines Eiweißfäulnisgemisches nach neuen Methoden. Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 42. S. 629 (1906).

[5]) *Gautier* und *Étard,* Über den Mechanismus der fauligen Gärung und über die dabei gebildeten Alkaloide. Compt. rend. T. 94. p. 1600 (1882) und Über die Produkte der Bakterienfäulnis der Albuminstoffe. T. 97. p. 264 (1883).

wie *Gautier* und *Étard* glauben, ein Pyridinderivat (Parvolin) ist, muß noch erwiesen werden.

Darstellung der Basen $C_8H_{13}N$ und $C_9H_{13}N$ aus faulen Makrelen nach Gautier und Étard.

Von den flüssigen Produkten der Fäulnis von Makrelen trennt man das Öl ab, säuert mit Schwefelsäure an und verdampft im Vakuum, wobei flüchtige Säuren, Phenol, Indol etc. verfliegen. Der Rückstand wird mit Baryt alkalisch gemacht, filtriert und dann mit Chloroform fraktioniert extrahiert. In die ersten Chloroformextrakte geht die Base $C_9H_{13}N$, in den letzten Chloroformauszügen findet man den Körper $C_8H_{13}N$. Um die Basen aus den Extrakten zu gewinnen, destilliert man das Chloroform bei möglichst niedriger Temperatur und im Vakuum bzw. im Kohlensäurestrom ab. Den Rückstand säuert man jetzt mit Weinsäure an, filtriert und extrahiert schließlich aus dem durch Kaliumkarbonat bzw. (was vorteilhafter ist) Natriumkarbonat von neuem alkalisch gemachten Filtrate die Basen durch Äther. Man verdampft dann den Äther und trocknet die Base im Vakuum.

$C_9H_{13}NO$, wurde aus fauler Leber vom Kabeljau erhalten.[1]) Die Darstellung siehe beim p-Hydroxyphenyläthylamin, Seite 1035.

$C_9H_{21}N_2O_5$. Diese Base wurde von *Griffiths*[2]) durch mehrtägige Zersetzung von peptonisierter Gelatine durch Bacillus fluviatilis in perlmutterglänzenden Prismen erhalten: sie ist nicht giftig, aber stark harntreibend. Über die Darstellung sagt *Griffiths* nur, daß sie nach *Gautiers* Methode geschah.

$C_{10}H_{13}N$ wurde nach *Gautiers* Verfahren aus fünfmonatlicher Fäulnis von Fibrin dargestellt von *Guareshi* und *Mosso*.[3]) Die Autoren sind im Zweifel, ob der Base die Formel $C_{10}H_{13}N$ oder $C_{10}H_{15}N$ zukommt. Bräunliches, schwach pyridinartig riechendes, an der Luft verharzendes Öl. In Wasser wenig löslich, macht dasselbe aber stark alkalisch. Platinat, $(C_{10}H_{13}N)_2 . 2HCl . PtCl_4$, in Wasser und Alkohol schwer löslich.

Gewinnung der Base $C_{10}H_{13}N$ nach Guareshi und Mosso mit der Methode von Gautier und Étard.

140 *kg* gut gewaschenes, nur sehr wenig Blut enthaltendes Ochsenblutfibrin werden in zwei Gefäßen von glasiertem Ton (0·6 *m* × 0·4 *m*), welche auf Dreifüßen stehend mit je einer großen Glocke von Zinkblech (1 *m* × 0·75 *m*), die am oberen Ende einen Hahn zum Ablassen der Gase

[1]) *Gautier*, Sur les tyrosinamines. Bull. soc. chim. de Paris. [3.] T. **35**. p. 1195 (1906).

[2]) *Griffiths*, Über einen neuen im Regenwasser aufgefundenen Bacillus. Bull. soc. chim. [3.] T. **7**. p. 332 (1892).

[3]) *Guareshi* und *Mosso*, Die Ptomaine, chemische, physiologische und gerichtlich-medizinische Untersuchungen. Arch. Ital. de Biologie. [2.] S. 367 (1883). — Dieselben. Journ. f. prakt. Chem. (2). Bd. **27**. S. 425 (1883); Bd. **28**. S. 504 (1883).

trägt, bedeckt sind, während 5 Sommermonaten sich selbst überlassen. Der Rand der Glocken taucht 15 *cm* tief in Wasser ein. Nach dieser Zeit hat sich das Fibrin in eine dicke, dunkelrote, homogene Flüssigkeit verwandelt. Man gibt jetzt auf je 20 *l* 130 *cm*³ 10⁰/₀iger Schwefelsäure und dampft auf dem Wasserbade bei zirka 60° ein. Der dicke Brei wird mit Barytwasser alkalisch gemacht, abfiltriert und das Filtrat lange mit Chloroform geschüttelt, und zwar auf 6 *l* Lösung anfangs 1 *l*, dann 1½—2 *l* Chloroform verwandt und im ganzen zwölfmal extrahiert. Die Chloroformlösung befreit man durch Abdestillieren vom Chloroform und versetzt den übelriechenden Rückstand mit konzentrierter Weinsäurelösung, wobei sich ein braunes Harz ausscheidet, das durch Ausschütteln mit Äther beseitigt wird. Die farblos gewordene Flüssigkeit versetzt man mit 50⁰/₀iger Kalikarbonatlösung im Überschuß, worauf sich braune Öltröpfchen an der Oberfläche ansammeln, die mit Äther aufgenommen werden und beim Verdampfen desselben zurückbleiben. Aus ihnen gewinnt man das in Alkohol, Äther und Wasser unlösliche Salz, $(C_{10}H_{13}N)_2 . 2 HCl . PtCl_4$, als fleischfarbenen, leichten, kristallinischen Niederschlag.

$\mathbf{C_{10}H_{15}N}$ wurde mit *Gautiers* und *Étards* Methode aus den Fäulnisprodukten der Seespinne gewonnen von *Oechsner de Coninck.*[1])

Die Base bildet eine gelbliche, klebrige, an der Luft rasch verharzende Flüssigkeit, die ohne Zersetzung bei 230° siedet, sich nur wenig in Wasser, leicht aber in Alkohol löst. Das Chlorid stellt gelbe zerfließliche Nadeln dar; Platinat in Wasser unlöslich. *Oechsner de Coninck* betrachtet sie nicht als eine Hydrobase, sondern als eine wirkliche Pyridinbase. *Gautier* aber hält sie für identisch mit der vorigen Base und bezeichnet beide als Coridin.

Oechsner de Coninck konnte aus seiner Base durch Oxydieren mit Kaliumpermanganat Nikotinsäure gewinnen. Über das Ausgangsmaterial siehe die bei der Base $C_8H_{11}N$ gemachten Angaben.

$\mathbf{C_{10}H_{17}N}$. Diese Base wurde von *Griffiths*[2]) durch Züchtung eines von ihm auf faulen Zwiebeln entdeckten sogenannten Bacterium allii auf peptonisierter Agar-Agar-Gelatine erhalten. Es bildet zerfließliche, mikroskopische, prismatische Nadeln, die sich in Wasser, Alkohol, Chloroform und Äther auflösen. Das Platinat, $(C_{10}H_{17}N)_2 . 2 HCl . PtCl_4$, ist schwer löslich in kaltem Wasser, unlöslich in Alkohol. *Griffiths* vermutet ein Hydrocoridin. — Über die Darstellung gibt er nur an, daß er mit den Methoden von *Gautier* und *Brieger* gearbeitet habe.

Sardinin, $C_{11}H_{11}NO_2$, giftige Base, dargestellt aus verdorbenen Sardinen von *Griffiths.*[3]) Farblos, kristallinisch, in wässeriger Lösung schwach alkalisch reagierend. Kristallinisches Chlorid, Chloraurat und Chloroplatinat.

---

[1]) *Oechsner de Coninck,* Beiträge zum Studium der Ptomaine. Compt. rend. T. **106**. p. 858 (1888); T. **110**. p. 1339 (1890); T. **112**. p. 584 (1891); T. **117**. p. 1097 (1893).

[2]) *Griffiths,* Über ein neues Fäulnisptomain, erhalten durch die Kultur von Bacterium allii. Compt. rend. T. **110**. p. 416 (1890).

[3]) *Griffiths,* Chem. News. Vol. **67**. p. 45 (1893). — Derselbe, Referat in der Apothekerzeitung. S. 495 (1893).

Es entstehen Fällungen mit Pikrinsäure, Silbernitrat und mit *Nesslers* Reagens.

Putrin, $C_{11} H_{26} N_2 O_3$, wurde aus gefaultem Pankreas isoliert von *Ackermann.*[1]) Das Goldsalz, $C_{11} H_{26} N_2 O_3 2 HCl . 2 AuCl_3$, bildet harte, dunkelorangefarbene Kristallkrusten, die bei 109—110° schmelzen. Seine Gewinnung ist gelegentlich der Methode von *Ackermann* und *Kutscher* geschildert auf Seite 1009.

Tetanin, $C_{13} H_{30} N_2 O_4$. Aus Kulturen des *Rosenbach*schen Bazillus auf Fleischbrei und aus Leichenteilen von *Brieger*[2]) gefunden. Die Base kristallisiert aus 96%igem Alkohol in schönen gelblichen Blättchen und läßt sich im Dampfstrome unzersetzt destillieren. Das Chlorhydrat ist zerfließlich. Das Platinat, $C_{13} H_{30} N_2 O_4 . 2 HCl . PtCl_4$, ist, nachdem es getrocknet ist, ziemlich schwer löslich.

Darstellung des Tetanins nach Brieger.

Ein Kolben von 1 *l* Inhalt wird mit 500 *g* Rindfleisch und so viel Wasser gefüllt, daß dasselbe bis nahe an den Kolbenhals reicht. Der Verschluß des Kolbens geschieht durch einen doppelt durchbohrten Kautschukstopfen, in dem zwei Röhren eingeführt sind, von denen die eine beinahe den Boden berührt, die andere nur ein wenig in den Hals des Kolbens hinabragt und nach außen **U**-förmig umgebogen ist. Die äußeren Öffnungen der Röhren verschließt man durch Watte, sterilisiert mehrstündig 4 Tage hintereinander und impft mit Tetanusbazillen.[3]) Sodann wird Wasserstoff eingeleitet und in das **U**-förmige Rohr, dessen äußerer Schenkel eine kleine Kugel trägt, eine geringe Quantität ausgekochten Quecksilbers und Wassers gegossen, welches als Ventil zur Verhütung des Entweichens des Wasserstoffgases dient. Ist die Luft nun völlig durch das Wasserstoffgas verdrängt, so wird das Zuleitungsrohr abgeschmolzen und der Kolben 8 Tage lang bei 37—38° belassen. Um die frei werdenden, sehr übelriechenden Gase zu beseitigen, werden sie in ein Gemisch von Kalium bichromicum und verdünnter Schwefelsäure geleitet.

Bei der Verarbeitung der Kultur auf Tetanin wird nach der oben geschilderten *Brieger*schen Vorschrift vorgegangen und man findet die Base dann im Filtrate der Quecksilberfällung, die man vorher gut auswaschen muß. Nach Entfernung des Quecksilbers aus diesem Filtrat mit Schwefelwasserstoff in wässeriger Lösung dampft man ein, nimmt den Rückstand wiederholt mit absolutem Alkohol, in dem das Tetaninchlorid löslich ist, auf, um den Salmiak möglichst zu entfernen und fällt dann mit alkoholischer Platinchloridlösung. Die Fällung, welche abgesaugt wird, besteht größtenteils aus

[1]) *D. Ackermann,* Ein Beitrag zur Chemie der Fäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54. S. 20 (1907/08).

[2]) *Brieger,* Ptomaine. III. S. 93. — Derselbe, Über ein neues Krämpfeverursachendes Ptomain. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 19. S. 3119 (1886).

[3]) Die aber bei *Brieger* mit geringen Mengen anderer Bakterien untermischt waren.

Platinsalmiak und Kreatininchloroplatinat, während aus dem Filtrat das Tetaninplatinat durch Äther als flockiger Niederschlag abgeschieden wird. Dieser zerfließt sofort, wenn er auch nur mit sehr geringen Mengen Wasser in Berührung kommt; nachdem man ihn schnell abgesaugt und aus 96⁰/₀igem Alkohol umkristallisiert hat, bekommt man prachtvolle hellgelbe Plättchen von Tetaninplatinat, welche im Exsikkator getrocknet viel schwerer löslich in Wasser geworden sein sollen, so daß man sie noch einmal aus Wasser umkristallisieren kann. Die Verluste beim Reinigen des Körpers sind nicht unbedeutend.

$C_{14}H_{12}N_2O_2$, unbenannte Base, die aus Fibrinfäulnis gewonnen wurde von *Guareshi*.[1]) Sie kristallisiert in glänzenden, in Wasser und Alkohol löslichen Tafeln, schmilzt bei 248—250⁰ und erstarrt nach dem Erkalten wieder kristallinisch. Beim trockenen Erhitzen mit Ätzkalk destilliert daraus die Base $C_{10}H_{15}N$ über. Die Methode der Darstellung war dieselbe wie die für die Base $C_{10}H_{13}N$ geschilderte.

Pyocyanin, $C_{14}H_{14}NO_2$, ist der Farbstoff des blauen Eiters, gebildet vom Bac. Pyocyaneus.[2]) In Wasser, Chloroform und Alkohol leicht lösliche, in Äther schwer lösliche Kristalle, deren Lösung sich mit Säuren kirschrot, mit Alkalien blau färbt; sie läßt sich im Dunkeln unzersetzt aufbewahren. Das Platinat und Pikrat kristallisiert.

Darstellung des Pyocyanins nach Ledderhose.

Eine Anzahl flacher Porzellanschalen von ca. $^1/_4$ *l* Inhalt werden mit sterilisierter Nährgelatine (3⁰/₀ Pepton, 0·5⁰/₀ Fleischextrakt, 0·5⁰/₀ Traubenzucker, 10⁰/₀ Gelatine) beschichtet und mit dem Bacillus pyocyaneus *J. Ernst* an zahlreichen Stellen geimpft und nachdem zuerst bei Zimmertemperatur ein Anwachsen der Bazillen eingetreten ist, im Brütofen einer Temperatur von 35⁰ ausgesetzt. Nach 6—8 Tagen ist die Reaktion aus einer schwach alkalischen eine sehr stark alkalische geworden und die Flüssigkeit intensiv blau. Die Flüssigkeiten werden nun im großen Kolben energisch mit Luft geschüttelt, wobei die blaue Färbung erheblich dunkler und intensiver wird. Hierauf schüttelt man sie im Scheidetrichter mit Chloroform, welches leicht den ganzen Farbstoff aufnimmt. Man mengt jetzt diesen Chloroformextrakt mit gesättigter wässeriger Pikrinsäurelösung, die man im Überschuß zusetzt; dadurch wird der Farbenton zuerst rötlichviolett und an der Grenze der beiden Flüssigkeiten scheidet sich ebenso wie an der Wand des Glases pikrinsaures Pyocyanin als dunkelrotbraunes Häutchen ab; dann hat sich das Chloroform völlig entfärbt. Das Pikrat kann man mit Äther auf dem

[1]) *Guareshi*, Untersuchungen über die Basen, welche sich unter den Produkten der Fäulnis finden. Ann. di Chim. e Farmac. 4. Ser. **6**. p. 237 (1887). — Untersuchungen über die Basen, welche sich unter den Produkten der Fäulnis finden. Gazz. Chim. Vol. **17**. p. 503 (1887).

[2]) *Ledderhose*, Über den blauen Eiter. Deutsche Zeitschr. f. Chirurgie. Bd. 28. S. 201 (1888). — *Fordos*, Untersuchungen über die Farbstoffe des blauen Eiters, Pyocyanin und Pyoxanthose. Compt. rend. T. **56**. p. 1128 (1862).

Filter von anhaftender freier Pikrinsäure reinwaschen, da es in Äther unlöslich ist. Hierauf wird es aus Alkohol umkristallisiert und erscheint nun in schön ausgebildeten schwarzroten Nadeln.

$C_{10} H_{24} N_2 O_4$, unbenannte Base, aus verdorbenem Schafkäse in Mengen von einigen Dezigrammen gewonnen von *Lepierre.*[1]) Sie kristallisiert gut, ist geruchlos, schmeckt bitter und ist in Wasser wenig, mehr in Alkohol löslich. Platinat und Aurat kristallisieren. *Lepierre* gibt über die Darstellung nur an, daß er die Methode von *Gautier* benutzt habe.

Scombrin, $C_{17} H_{38} N_4$, aus gefaulten Makrelen.[2]) Aus den Mutterlaugen des Hydrocollidinplatinates gewonnen als Platinat, $C_{17} H_{38} N_4 . 2 HCl Pt Cl_4$, in gelblich-fleischfarbenen Nadeln, welche schon bei 100° sich zersetzen unter Entwicklung eines fliederähnlichen Geruches. Die Darstellung ist gleichzeitig mit der der Base $C_8 H_{13} N$ geschildert, auf S. 1034.

Morrhuin, $C_{19} H_{27} N_3$ [3]), findet sich im Lebertran, indem es ein Drittel aller Basen ausmacht. Dicke, gelbliche, nach Holunder riechende, ätzende Flüssigkeit von alkalischer Reaktion. Sie ist leichter als Wasser und darin etwas löslich. Starkes Diuretikum. Leicht lösliches Chloraurat. Das Platinat zersetzt sich beim Erwärmen rasch. Die Darstellung siehe S. 1043.

Aselin, $C_{25} H_{32} N_4$ [3]), im Lebertran in geringer Menge aufgefunden. In Wasser ist die Base fast unlöslich, löslich aber in Alkohol und Äther, schmeckt bitter, reagiert alkalisch. Kristallinisches Chlorid. Aurat und Platinat sind veränderlich. Die Isolierung ist im folgenden geschildert.

Darstellung von Basen aus Lebertran nach Gautier und Mourgues.

100 *kg* gelber Lebertran werden mit dem gleichen Volumen 33%igem Alkohol, der im Liter 4 *g* Oxalsäure enthält, erschöpft. Die wässerig alkoholischen Lösungen werden beinahe vollständig mit Kalk gesättigt, filtriert und bei 45° im Vakuum abdestilliert. Gegen Schluß der Destillation gibt man gefälltes Calciumkarbonat hinzu und etwas Kalkwasser, worauf im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 90%igem Alkohol aufgenommen wird. Den so erhaltenen Extrakt befreit man im Vakuum vom Alkohol, gibt zum Rückstand etwas Wasser und starke Kalilauge, worauf man mit Äther ausschüttelt. Dieser nimmt dann die Basen auf, welche man nun niederschlägt, indem man zur ätherischen Basenflüssigkeit eine Lösung von Oxalsäure in Äther gibt. Auf diese Weise wurden einmal 52 *g*, ein andermal 65 *g* oxalsaure Basen aus 100 *kg* Lebertran gewonnen.

Man löst die Oxalate jetzt in Wasser, gibt Kalilauge hinzu und scheidet auf diese Weise die freien Basen als ein über der wässerigen

[1]) *Lepierre,* Analyse eines verdorbenen Käses und Extraktion eines neuen Ptomains. Compt. rend. T. **118**. p. 476 (1894).

[2]) *Gautier,* Ptomaines et leucomaines. Extrait du bulletin de l'acad. de méd. 12 et 19 janv. 1886.

[3]) *Gautier* et *Mourgues*, Über die Alkaloide aus Lebertran. Compt. rend. T. **107**. p. 110 et 626 (1888).

Flüssigkeit schwimmendes Öl ab. Dies muß jetzt abgeschieden und mit frisch geglühtem Kali getrocknet werden. So ließen sich aus je 1 *kg* Ausgangsmaterial 0·35—0·5 *g* trockne Alkaloide erhalten.

Um aus dem Basengemenge, das fast gleiche Mengen von flüchtigen und nicht flüchtigen Substanzen enthält, die einzelnen Komponenten abzutrennen, wird dasselbe im Ölbade der fraktionierten Destillation unterworfen und man erhält:

In die 1. Fraktion zwischen 87° und 90° übergehend Butylamin,
„ „ 2. „ „ 96° „ 98° „ Amylamin,
„ „ 3. „ etwas unter 100° übergehend Hexylamin,
„ „ 4. „ zwischen 198° und 200° übergehend Hydrolutidin.

Man destilliert noch bis 215°, läßt dann erkalten und extrahiert den braunen, sehr dicklich gewordenen Rückstand mit Äther, darauf beseitigt man aus dem ätherischen Extrakt den Äther durch Abdunsten. Der nun verbleibende schmierige Sirup wird in verdünnter Salzsäure gelöst, was langsam aber schließlich fast vollständig gelingt. Jetzt gibt man Platinchloridlösung hinzu und schlägt auf diese Weise das in der Kälte sehr schwer lösliche Platinat des Asellins nieder, während das sehr viel löslichere Platindoppelsalz des Morrhuins aus der Mutterlauge durch Einengen im Vakuum erhalten wird.

Isolierung von Basen aus den Extrakten der Muskeln.

Von **D. Ackermann**, Würzburg.

1. Methode von Kutscher, angewandt auf Extractum carnis Liebig.[1])

Gewinnung von Kreatin, Kreatinin, Carnosin, Methylguanidin, Carnomuskarin, Neosin, Carnitin, Neurin, Cholin, Oblitin, Histidin und Vitiatin.

450 *g Liebigs* Fleischextrakt (es ist nicht ratsam, weniger zu nehmen) werden in 2500 cm^3 Wasser gelöst, wenn nötig, mit Phosphorsäure angesäuert und mit einer 20%igen Tanninlösung gefällt. Eine Probe der ausgefällten Flüssigkeit darf auf vorsichtige Zugabe von Tanninlösung keine oder nur eine schwache Trübung zeigen. Man braucht, um dies zu erreichen, etwa 500—600 *g* Tannin.[2])

Die ausgefällte Flüssigkeit läßt man 24—28 Stunden an einem kühlen Orte stehen. In dieser Zeit sintert der mächtige Tanninniederschlag zu einer braunen, zusammenhängenden Masse von pechartiger Konsistenz zusammen, über der eine klare, gelbliche Flüssigkeit steht, die man meist ohne Filtration vom Niederschlag abgießen kann, doch filtriert sie auch leicht. Der Niederschlag wird nun oberflächlich gewaschen und die Flüssigkeit zur Entfernung des überschüssigen Tannins mit Barytwasser versetzt. Um nicht zu große Flüssigkeitsmengen zu erhalten, benutzt man eine, auf 50° erwärmte, und bei dieser Temperatur gesättigte Lösung

---

[1]) *Fr. Kutscher,* Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. **10**. S. 528 (1905) und Bd. **11**. S. 582 (1906).

[2]) Es macht sich hier oft eine auffallende Erscheinung bemerkbar. Nachdem zuerst ein massiger Niederschlag in der Flüssigkeit aufgetreten ist, stellt sich ein Stadium ein, in dem sich die Flüssigkeit auf weitere Zufügung von Tanninlösung milchig trübt. Erneute Zugabe von Gerbsäure scheint nun nichts mehr zu ändern, wenn man nur die Hauptmasse der Flüssigkeit beobachtet. Versetzt man dagegen eine kleine Menge der trüben Flüssigkeit vorsichtig unter Umschütteln mit Tanninlösung, so beobachtet man bald das Auftreten eines neuen flockigen Niederschlages, der die Trübung mitreißt. Auch die Hauptmasse der trüben Flüssigkeit muß man dann in solchen Fällen noch solange mit Tanninlösung behandeln, bis sich beim Umrühren der flockige Niederschlag zeigt. Mit dem Auftreten desselben ist die Ausfällung in der Regel beendet.

von Baryumhydroxyd. Man soll Barytwasser solange zusetzen, bis sich an der Oberfläche der gefällten Flüssigkeit beim Umrühren ein rötlicher Schaum zeigt. Die Filtration des mächtigen Niederschlages von Baryumtannat wird mit der *Kossel*schen Nutsche ausgeführt. Um aus dem mißfarbenen Filtrate die letzten Reste des Tannins zu beseitigen, geht man in folgender Weise vor: Dasselbe wird mit Schwefelsäure sehr schwach übersäuert und in die Flüssigkeit, ohne vorher das ausgefallene Baryumsulfat zu entfernen, Bleioxyd im Überschuß eingetragen. Es genügt die von *Kahlbaum* in den Handel gebrachte bessere Marke, vorteilhaft ist allerdings frisch gefälltes. Rührt man die mit Bleioxyd versetzte Flüssigkeit mit dem Glasstabe einige Zeit um, so wird sie schnell fast farblos und nimmt meist alkalische Reaktion an. Das Blei hat die Reste des Tannins und die überschüssige Schwefelsäure aufgenommen, aber sicher sind noch andere Körper damit schwer lösliche Verbindungen eingegangen.[1])

Vom Baryumsulfat und dem, was mit ihm den Niederschlag bildet, wird abgesaugt, und wenn die Reaktion des Filtrates an sich schon alkalisch gegen Lackmus ist, engt man es direkt auf freier Flamme, dann auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup ein. War aber die Reaktion des Filtrates sauer, so gibt man noch etwas frisch gefälltes Bleioxyd hinzu; beim Einengen stellt sich dann auch hier bald alkalische Reaktion ein. Die auf ein kleines Volumen gebrachte Flüssigkeit erstarrt, wenn man sie 24—48 Stunden an einem kühlen Orte stehen läßt, zu einem Kristallbrei, der der Hauptsache nach aus Kreatin und Kreatinin besteht. Die Kristalle werden scharf abgesaugt und nur mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen, um nicht zuviel von dem leicht löslichen Kreatinin in das Waschwasser zu bekommen. Die Mutterlauge der Kristalle wird mit dem Waschwasser vereinigt und mit Schwefelsäure angesäuert, worauf Bleisulfat ausfällt, das man durch Filtrieren beseitigt. Das neue Filtrat wird mit 20%iger Silbernitratlösung ausgefällt. Der entstehende Niederschlag (Silberniederschlag I) besteht der Hauptsache nach aus Chlorsilber und den Resten der Purinbasen, doch mögen auch noch andere Körper hineingehen. Nach 24 Stunden saugt man diesen Niederschlag ab, das Filtrat davon wird mit 20%iger Silbernitratlösung versetzt, bis eine Probe, in gesättigtes Barytwasser gebracht, nicht mehr einen weißen, sondern sofort einen braunen Niederschlag gibt. Man hat, um diesen Punkt zu erreichen, etwa 150—200 *g* Silbernitrat notwendig. Nunmehr fügt man der silberhaltigen Flüssigkeit solange kalt gesättigtes Barytwasser hinzu, bis ein Tropfen, auf einer Glasplatte mit ammoniakalischer Silberlösung[2]) versetzt, nur eine geringe oder gar keine Fällung mehr zeigt. Dann saugt man ab und wäscht etwas mit Wasser nach.

[1]) Dieser Niederschlag ist bisher nicht näher untersucht.

[2]) Die Bereitung der ammoniakalischen Silberlösung geschieht, indem man 10%ige Silbernitratlösung mit 10%iger Ammoniaklösung versetzt, bis sich der zuerst ausfallende Niederschlag von Silberoxyd gerade gelöst hat. Dann fügt man noch einen Tropfen Ammoniak hinzu.

Dieser Silberniederschlag II enthält in der Hauptsache Kreatinin- und Carnosinsilber; um die beiden Basen voneinander zu trennen wird der Niederschlag mit Wasser verrieben, ein wenig Schwefelsäure zugegeben, um den anhaftenden Baryt zu beseitigen und nun Schwefelwasserstoff eingeleitet. Vom Schwefelsilber filtriert man ab und engt das Filtrat zum Sirup ein. Derselbe erstarrt bald zu einem Kristallbrei. Dieser besteht aus Kreatinin, das in absolutem Alkohol leicht löslich, und aus Carnosin, das darin selbst in der Hitze kaum löslich ist. Man kocht deshalb den Sirup mitsamt den Kristallen mit absolutem Alkohol mehrfach aus und bekommt so das Kreatinin in die alkoholische Lösung, das Carnosin aber hat man als kristallinischen Rückstand. Um diesen noch von etwas ihm anhaftenden Kreatin zu befreien, kann man ihn in Wasser auflösen, mit Tierkohle entfärben und zum Sirup einengen, worauf meist ein wenig Kreatin zur Ausscheidung kommt, von dem man absaugt. Jetzt überschichtet man die dickliche Flüssigkeit mit absolutem Alkohol und läßt das Gemisch leicht bedeckt stehen. Nach einiger Zeit hat sich das Carnosin in festen Krusten abgeschieden, die man wegen ihrer großen Löslichkeit in Wasser nicht hieraus allein umkristallisieren kann. Man muß vielmehr genau, wie eben geschildert, nachdem man die Kristalle in Wasser gelöst hat, sie durch absoluten Alkohol von neuem zur Abscheidung bringen.

Das Filtrat vom Silberniederschlag II wird mit Barytwasser solange versetzt, als noch eine Fällung entsteht. Dieselbe heiße Silberniederschlag III. Man saugt ihn ab, schwemmt ihn in Wasser auf und leitet Schwefelwasserstoff bis zur völligen Ausfällung des Silbers ein. Dann wird abgesaugt. Das Filtrat scheidet beim Einengen zum Sirup etwas Baryumkarbonat ab, das durch Filtrieren beseitigt wird. Jetzt gibt man Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaktion hinzu und dampft von neuem auf ein kleines Volumen ein. Es scheidet sich dann schnell das in kaltem Wasser ziemlich schwer lösliche Methylguanidinnitrat in weißen, glänzenden Blättern ab, die nach dem Umkristallisieren aus Wasser analysiert werden können.

Das Filtrat des Silberniederschlages III befreit man durch Salzsäure vom Silber und durch Schwefelsäure vom Baryt, säuert mit Schwefelsäure so an, daß die Lösung etwa 5%ig ist und fällt mit Phosphorwolframsäure, von der man soviel zugeben muß, daß eine Probe auf erneute Zugabe des Fällungsmittels längere Zeit (1—2 Minuten) klar bleibt. Nach 12 Stunden saugt man den Niederschlag ab und zersetzt ihn mit Barytwasser unter Verreiben, wie auf S. 1007 näher geschildert. Das Baryumphosphorwolframat, welches sich hierbei ausscheidet, muß abfiltriert und gut mit Wasser ausgewaschen werden. Dann leitet man in Filtrat und Waschwasser, die man vereinigt, Kohlensäure ein, bis kein Baryumkarbonat mehr niedergeschlagen wird. Man saugt von demselben ab und engt die so erhaltene Lösung zum Sirup ein. Derselbe erstarrt schnell zum Kristallbrei, der der Hauptsache nach aus Kreatin, Kreatinin und Kaliumkarbonat

besteht. Man saugt diese Kristalle ab und wäscht sie mit wenig kaltem Wasser. Die Mutterlauge samt dem Waschwasser wird wieder zum Sirup eingeengt, der mit konzentrierter starker Salzsäure angesäuert und solange mit absolutem Alkohol versetzt wird, als die entstehende kristallinische Fällung sich vermehrt. Mengen sich dem Niederschlag schmierige Bestandteile bei, dann ist der Flüssigkeit noch Salzsäure zuzufügen, durch die sie wieder in Lösung gebracht werden. Der Niederschlag, der nur aus anorganischen Salzen, namentlich Kaliumchlorid, besteht, wird abfiltriert und mit Alkohol gewaschen. Das Filtrat engt man auf dem Wasserbade soweit ein, bis eine abgekühlte Probe auf Zusatz von gesättigter, kalter alkoholischer Quecksilberchloridlösung sofort einen starken, körnig-kristallinischen Niederschlag fallen läßt. Ist dieser Punkt erreicht, dann fällt man die ganze Masse mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung aus. Nach 24—48 Stunden saugt man die Fällung ab und wäscht sie mit alkoholischer Sublimatlösung aus, worauf man auf dem Filter Quecksilberfällung I hat.

Quecksilberfällung I löst man in heißem Wasser auf, schlägt alles Quecksilber mit Schwefelwasserstoff nieder und filtriert, worauf man das Filtrat zum Sirup einengt und mit absolutem Alkohol aufnimmt. Dabei bleibt etwas anorganische Substanz zurück, von der unter Nachwaschen mit absolutem Alkohol abfiltriert wird. Jetzt fällt man diese alkoholische Lösung unter sorgfältiger Vermeidung eines größeren Überschusses mit alkoholischer Platinchloridlösung, worauf man die entstandene Fällung absaugt und mit absolutem Alkohol etwas auswäscht. Dann trennt man diesen Niederschlag durch Verrühren in wenig kaltem Wasser in einen darin schwer löslichen und in einen darin leicht löslichen Teil. Der erstere in kaltem Wasser schwer lösliche Teil ist das noch nicht genau untersuchte Platinat des Carnomuskarins, das nur in geringer Menge auftritt. Filtriert man von ihm ab, so erhält man die in Wasser leicht löslichen Platinate des Neosins und Carnitins. Um sie voneinander zu trennen, muß aus der Lösung der Platinate das Metall durch Einleiten von Schwefelwasserstoff beseitigt werden; man engt die so erhaltene Lösung der Chloride nun stark ein und fällt mit 10%iger wässeriger Goldchloridlösung fraktioniert aus. Die einzelnen Fällungen werden abgesaugt und so oft umkristallisiert, bis ihr Goldgehalt konstant geworden ist. Das Filtrat der einzelnen Fällungen ist, bevor man es von neuem mit Goldchlorid fällt, immer wieder zum dünnen Sirup einzuengen, da die eine der hier ausfallenden Verbindungen, trotzdem ihr Goldsalz in Wasser schwer löslich ist, merkwürdigerweise nur aus stark konzentrierter Lösung ausfällt. Aus den ersten 2—3 Fraktionen[1]) wird manchmal, aber nicht immer, in nicht zu großer Menge Neosingoldchlorid erhalten. Weit reichlicher und stets vorhanden ist die in den späteren Fraktionen mit

[1]) In manchen Fällen hat *Kutscher* an Stelle des Neosins in diesen Fraktionen die Goldsalze des Cholins und Neurins gefunden, die er durch fraktionierte Kristallisation voneinander zu trennen vermochte.

Goldchloridlösung fallende Base, das Carnitin. Ihr Goldsalz bildet meist schon in der dritten Fraktion den alleinigen Bestandteil der Fällung als ein rotes, bald kristallinisch werdendes Öl.

Engt man das alkoholische Filtrat der Quecksilberfällung I ein und läßt es bedeckt einige Tage an einem kühlen Ort stehen, so findet eine reichliche Kristallabscheidung statt.

Diese Quecksilberfällung II muß abgesaugt werden: nachdem man sie mit etwas alkoholischer Quecksilberchloridlösung gewaschen hat, löst man sie in Wasser, leitet solange Schwefelwasserstoff ein, bis das Quecksilber völlig niedergeschlagen ist, filtriert und engt das Filtrat zum Sirup ein. Aus diesem Sirup kristallisiert nach einiger Zeit salzsaures Kreatinin aus, das man unter Benutzung seiner Schwerlöslichkeit im absoluten Alkohol abtrennt, indem man den Sirup damit gut verreibt, absaugt und die Kristalle noch etwas mit absolutem Alkohol wäscht. Das alkoholische Filtrat wird unter Vermeidung eines Überschusses mit alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt und das Ganze einige Zeit stehen gelassen. Dann saugt man die voluminöse Fällung ab, wäscht sie mit absolutem Alkohol und schwemmt sie in wenig Wasser auf. Der Rückstand wird jetzt abgesaugt, in heißem Wasser gelöst und die Lösung auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft. Diese besteht aus dem Platinat des Oblitins, welches man nach dem Erkalten absaugen und mit kaltem Wasser und Alkohol waschen muß. Es ist dann sofort analysenrein.

Das Oblitin gerät manchmal auch in die Quecksilberfällung I hinein und findet sich dann bei deren Aufarbeitung an der Stelle des Karnomuscarins gleichfalls als Platinat.

Das Filtrat der Quecksilberfällung II wird jetzt abwechselnd solange mit gesättigter alkoholischer Natriumacetatlösung und mit gesättigter alkoholischer Quecksilberchloridlösung versetzt, bis mit keinem dieser Fällungsmittel mehr ein Niederschlag entsteht, dann läßt man bis zum anderen Tage stehen, saugt den Niederschlag ab und wäscht ihn mit einem Gemenge beider Fällungsmittel aus. Hierauf wird der Niederschlag in eine Schale getan und der anhaftende Alkohol davon auf dem Wasserbade abgedunstet, unter Zusatz von etwas Salzsäure in Wasser gelöst und Schwefelwasserstoff in ihn hineingeleitet, bis alles Quecksilber ausgefällt ist. Man saugt jetzt ab, engt zum Sirup ein und beseitigt das sich jetzt ausscheidende Kochsalz durch Aufnehmen mit absolutem Alkohol. Die alkoholische Lösung wird nun etwas eingeengt und mit einer heißgesättigten alkoholischen Cadmiumchloridlösung vollständig ausgefällt. Nach 24 Stunden saugt man die Cadmiumfällung ab, wäscht sie mit kaltgesättigter alkoholischer Cadmiumchloridlösung, worauf man sie mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt. Vom Cadmiumsulfid wird abgesaugt, die Lösung der Chloride zum Sirup eingedampft, und nun scheidet sich sehr bald Histidindichlorid aus. Man wäscht dieses Salz mit konzentrierter Salzsäure und absolutem Alkohol. Die Mutterlauge des Histidindichlorides wird nun noch etwas eingeengt und mit 30%iger wässeriger Goldchlorid-

lösung gefällt, worauf das Vitiatinchloraurat als ein in breiten glänzenden Platten kristallisierendes Goldsalz auftritt.

Die nun zu schildernde Methode schließt sich in ihrer jetzigen Form in manchen Punkten eng an die vorige an; auch hier finden sich die drei Silberfällungen, nur wird statt mit Gerbsäure mit neutralem essigsauren Blei vorgereinigt und die Isolierung des Carnitins erfolgt mit Hilfe von Kaliumwismutjodid.

2. Methode von Gulewitsch und Krimberg, angewandt auf den Extrakt von frischem Rindfleisch.[1])

(Gewinnung von Carnosin, Methylguanidin und Carnitin.)

Unmittelbar nach dem Schlachten eines Ochsen wird ein Stück Fleisch (Rippenkreuz) ausgeschnitten, nach Möglichkeit von Knochen, Fett und Bindegewebe gereinigt, schnell in dünne Streifen und Stückchen geschnitten und sofort in kochendes Wasser geworfen. Die Operation der Reinigung und Zerkleinerung des Fleisches dauert ungefähr eine halbe Stunde. Das Gewicht des auf solche Weise gewonnenen Muskelgewebes muß ca. 4—5 *kg* betragen. Nachdem alles Fleisch in Wasser gebracht ist, wird die Flüssigkeit noch eine halbe Stunde gekocht, dann das Fleisch fein zerhackt und mit der abgegossenen Flüssigkeit noch eine Stunde lang gekocht. Alsdann wird die Flüssigkeit durch Musselin koliert und das mit Hilfe eines Handtuches ausgepreßte Fleisch auf die angegebene Weise mit frischem Wasser noch zweimal ausgekocht. Die vereinigten gelblich gefärbten Auszüge sollen ungefähr 25 *l* betragen und reagieren amphoter auf Lackmus, sie werden bis auf 2 *l* eingeengt und mit einer 20%igen Lösung von neutralem essigsauren Blei gefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und gewaschen, das Filtrat mittelst Schwefelwasserstoff entbleit. Das Filtrat vom Schwefelblei wird bis auf etwa $^3/_4$ *l* eingeengt und mit einer konzentrierten Lösung von Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines größeren Überschusses derselben ausgefällt. Der entstandene reichliche Niederschlag wird am anderen Tage abgesaugt, gewaschen und durch Zerreiben mit Barythydrat bei Zimmertemperatur zersetzt. Das durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreite Filtrat wird mit Salpetersäure neutralisiert, auf etwa $^1/_2$ *l* eingedampft und mit 20%iger Silbernitratlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Die ausgeschiedenen Silberverbindungen der Purinbasen (Silberniederschlag I) werden abgesaugt und gewaschen, worauf man zum Filtrat weitere Mengen Silbernitratlösung hinzufügt, bis eine kleine Probe der Flüssigkeit auf einem Uhrglas mit Barythydrat vermischt, keine weiße, sondern eine gelbe, schnell schwarz werdende Fällung

[1]) *Wl. Gulewitsch* und *R. Krimberg*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45. S. 326 (1905). — *Wl. Gulewitsch*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47. S. 471 (1906). — *R. Krimberg*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. IV. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48. S. 412 (1906). — *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Physiol. u. Path.-chem. Analyse. Berlin 1909. Hirschwald. 8. Aufl. S. 758.

liefert. Darauf wird die Flüssigkeit mit einer warmen Lösung von Barythydrat ausgefällt, der ziemlich reichliche Niederschlag abgesaugt und sorgfältig gewaschen.

Diesen Silberniederschlag II behandelt man bis zur Sättigung mit Schwefelwasserstoff, saugt das Schwefelsilber ab und sättigt mit Kohlensäure, worauf man nochmals filtriert, einengt und mit Salpetersäure neutralisiert. Bald darauf erstarrt die eingeengte Flüssigkeit zu einer festen Masse, welche aus sternartigen Drusen von nadelförmigen Kristallen von Carnosinnitrat besteht. Man saugt sie ab, wäscht mit verdünntem Alkohol, kristallisiert sie aus wenig Wasser um und kann aus dem ersten Filtrat und der Mutterlauge durch Einengen, eventuell nach vorherigem Entfärben mit Tierkohle neue Mengen desselben Salzes erhalten.

Aus dem Filtrat des Silberniederschlages II beseitigt man das Metall durch Schwefelwasserstoff, filtriert und macht mit Schwefelsäure neutral; darauf gibt man Magnesiumoxyd hinzu, rührt gut um und engt stark ein. Um die Schwefelsäure zu beseitigen, wird jetzt Barytwasser zugegeben, filtriert, der Überschuß desselben im Filtrat durch Kohlensäure niedergeschlagen, worauf man wiederum filtriert. Jetzt wird das Filtrat mit Salpetersäure neutralisiert und nach dem Einengen auf ein kleines Volumen mit 20%iger Silbernitratlösung solange versetzt, bis eine Probe der Flüssigkeit nicht einen weißen, sondern einen bald sich bräunenden gelben Niederschlag mit Barytwasser gibt. Ist dies der Fall, so fällt man mit Barythydratlösung vollständig aus. Man erhält auf diese Weise Silberniederschlag III, den man gut wäscht, in Wasser löst und durch Behandeln mit Schwefelwasserstoff und Filtrieren vom Metall befreit. Den Rest des in dem Filtrat enthaltenen Baryts beseitigt man durch genaues Ausfällen mit Schwefelsäure, neutralisiert mit Salpetersäure, kocht mit Tierkohle und filtriert. Die eingedampfte Flüssigkeit scheidet ziemlich große Drusen von kleinen und breiten Täfelchen des Methylguanidinnitrates aus, welche aus erkaltendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert werden.

Um nun das Carnitin zu gewinnen, muß das Filtrat des Silberniederschlages III mit Salzsäure neutralisiert werden, worauf man vom Chlorsilber absaugt und das Filtrat auf ein Volumen von 250 *cm*³ einengt. Dasselbe wird jetzt mit Kaliumwismutjodidlösung, dem sogenannten *Dragendorff*schen Reagens[1]), gefällt. Der entstehende reichliche, orangerote Niederschlag ist zuerst flockig und verwandelt sich bei weiterem Zusatz des Fällungsmittels in einen harzigen Klumpen. Die Flüssigkeit wird abgegossen.

[1]) Bei der Darstellung des *Dragendorff*schen Reagens hielten sich die Autoren an das folgende Rezept von *Kraut:* „Man löst einerseits 80 *g* Basisch-Wismutnitrat in 200 *cm*³ reiner Salpetersäure von 1·18 spez. Gew., andererseits 227 *g* Jodkalium in wenig Wasser und gießt die Wismutlösung langsam und unter Umschütteln in die Jodkaliumlösung, wobei sich der anfangs entstehende braune Niederschlag zur gelbroten Flüssigkeit löst. Aus dieser läßt man durch starkes Abkühlen den gebildeten Salpeter möglichst auskristallisieren, beseitigt die Kristalle und füllt die Flüssigkeit zu einem Liter auf. Die Wismutjodidjodkaliumlösung ist im Dunkeln aufzubewahren, da sie am Licht allmählich Wismutjodid ausscheidet. Eine derartige Lösung enthält 0·054—0·057 *g* Wismut in 1 *cm*³.

der Niederschlag mit Wasser abgespült und mit frisch gefälltem Bleihydroxyd gründlich verrieben. Es ensteht ein blaßgelber Niederschlag von Bleioxyjodid, von dem man absaugt; man wäscht ihn sodann nach und leitet in das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat Schwefelwasserstoff ein, um das Blei auszufällen. Nachdem vom Bleisulfid abfiltriert ist, resultiert eine alkalische Flüssigkeit, die kein Jod mehr enthalten darf. Jetzt engt man zum Sirup ein, worauf man denselben mit absolutem Alkohol aufnimmt. Den verbleibenden Rückstand extrahiert man mehrmals mit neuen Mengen Alkohol, vereinigt die Auszüge, engt sie ein, extrahiert den so erhaltenen Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol und fällt diesen Extrakt schließlich mit einer heißen konzentrierten alkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid aus. Mit der Zugabe dieses Fällungsmittels hört man auf, wenn die auszufällende Flüssigkeit schließlich nach Zugabe von kalt gesättigter alkoholischer Quecksilberchloridlösung für längere Zeit klar bleibt. Nach einigen Stunden verreibt man den entstandenen kristallinischen Niederschlag im Mörser mit Alkohol, saugt ihn ab und wäscht ihn mit Alkohol; es ist das Quecksilberdoppelsalz des Carnitins, $C_7 H_{15} NO_3 . 2 Hg Cl_2$. Um dasselbe zu reinigen, extrahiert man es unter Zusatz von Tierkohle mehrmals mit heißem Wasser. Aus den heiß filtrierten und vereinigten Auszügen scheidet sich dann oft ein geringer Niederschlag ab, den man durch Filtrieren beseitigt. Das wässerige Filtrat wird stark eingeengt, worauf sich das gereinigte Salz in Kristallnadeln abscheidet.

Wesentlich einfacher als die beiden eben geschilderten Methoden ist ein erst in jüngster Zeit von *Engeland* und *Kutscher* ausgearbeitetes Verfahren, mit Hilfe dessen man viel müheloser zu den meisten der bisher bekannten typischen Fleischbasen gelangt. Es ist dabei nämlich auf die Fällung mit Phosphorwolframsäure und die Darstellung der drei Silberniederschläge ganz verzichtet und an die Reinigung mit Tannin und Blei schließt sich sofort eine Ausfällung mit wässeriger Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung an.

3. Methode von Engeland[1]) und Kutscher angewandt auf Liebigs Fleischextrakt.

(Gewinnung von Kreatin, Kreatinin, Neosin, Carnitin, Vitiatin, Histidin, Methylguanidin, Dimethylguanidin und β-Alanin.)

Etwa 450 *g* Extractum carnis *Liebig* werden in $2^1/_2$ *l* warmen Wassers gelöst, mit 20%iger Tanninlösung ausgefällt und die Flüssigkeit vom Niederschlage dekantiert. Das Dekantat wird mit Barythydrat, vom überschüssigen Tannin mit Schwefelsäure, vom Baryt und von der Schwefelsäure mit Bleioxyd befreit. (Alle diese Manipulationen sind oben gelegentlich der Methode von *Kutscher* eingehend geschildert.) Die jetzt erhaltene klare, braun gefärbte Flüssigkeit engt man zunächst zum dünnen Sirup ein, welcher nach einiger

[1]) *R. Engeland*, Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. **16**. S. 658 (1908).

Zeit zu einem Kristallbrei erstarrt. Von den ausgeschiedenen Kristallen, die größtenteils aus Kreatin und Kreatinin bestehen, wird abgesaugt, worauf man sie mit wenig kaltem Wasser wäscht. Jetzt wird das Filtrat der Kristalle mit heiß gesättigter wässeriger Natriumacetat- und Quecksilberchloridlösung abwechselnd versetzt so lange, als auf unmittelbaren Zusatz der Fällungsmittel noch eine Trübung entsteht. Eine Probe der filtrierten Flüssigkeit soll nach dieser Behandlung, mit einem großen Überschusse von kalt gesättigter wässeriger Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung versetzt, auch nach längerem Stehen keine Trübung mehr absetzen. Nach dem Ausfällen wird längere Zeit stehen gelassen, dann von dem reichlichen körnig-kristallinischen Niederschlag abgesaugt und mit einer kalten Mischung von gesättigter wässeriger Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung gewaschen. Den Niederschlag bringt man nun in heißes, salzsäurehaltiges Wasser und digeriert ihn längere Zeit in der Hitze damit. Ein großer Teil der Fällung geht hierbei mit tiefbrauner Farbe in Lösung. Vom Ungelösten wird abgesaugt und das Filtrat durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wird auf dem Wasserbade eingeengt, bis reichliche Kristallisation auftritt. Dann wird erkalten gelassen und mit Methylalkohol aufgenommen. Hierbei bleiben die anorganischen Salze ungelöst zurück. Von ihnen wird abgesaugt und das Filtrat abgedampft. Der Rückstand wird in heißem Wasser gelöst und durch Kochen mit Tierkohle[1]) energisch entfärbt. Die geklärte Flüssigkeit wird zum Sirup eingeengt; beim Erkalten tritt in diesem eine reichliche Kristallisation auf, die vor allem aus Kreatininchlorid besteht. Es wird mit absolutem Alkohol, in dem dieses nicht löslich ist, versetzt, abfiltriert, der Filterrückstand mit absolutem Alkohol ausgewaschen und das Filtrat aufs neue zum Sirup eingeengt. Es scheidet sich nach Zugabe von absolutem Alkohol jetzt etwas Ammoniumchlorid aus, wovon man abfiltriert; das Filtrat wird nun mit gesättigter alkoholischer Quecksilberchloridlösung gefällt.

Durch Eintragen von gepulvertem Quecksilberchlorid in die heiße Flüssigkeit sorgt man für vollkommene Sättigung mit diesem Fällungsmittel. Der Niederschlag heiße Quecksilberfällung I. Man saugt ihn nach 24stündigem Stehen ab und wäscht mit gesättigter kalter, alkoholischer Quecksilberchloridlösung nach. Darauf wird die Fällung in heißem Wasser unter Zusatz von Salzsäure gelöst und mittelst Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Nachdem man das Filtrat vom Schwefelquecksilber auf dem Wasserbade zum Sirup eingeengt hat, scheiden sich Kristalle von Kreatininchlorid aus, die abgesaugt und mit absolutem Alkohol gewaschen werden.

[1]) Hierbei darf die Knochenkohle „Kahlbaum" nicht benutzt werden, denn sie enthält Calciumsulfat, das aus ihr in die entfärbte Flüssigkeit übergeht und sich später sehr unangenehm bemerkbar macht. Besser brauchbar ist die garantiert reine Knochenkohle von *Merck*, doch muß man auch sie vor dem Gebrauch noch mit Salzsäure extrahieren.

Das alkoholische Filtrat des Kreatininchlorides fällt man mit alkoholischer Platinchloridlösung unter sorgfältiger Vermeidung eines Überschusses, saugt die sehr voluminöse Fällung ab und wäscht sie mit absolutem Alkohol. Diese Fällung enthält Neosin, Carnitin und Vitiatin. Um diese Körper zu trennen, geht man folgendermaßen vor. Man löst die Platinfällung in heißem Wasser unter Zusatz von Salzsäure, von dem geringen unlöslichen schmierigen Rückstand filtriert man ab und engt bei etwa 80° ein. Es scheidet sich eine geringe Menge eines in Oktaedern kristallisierenden Platinates (vielleicht Carnorumskarinplatinat) ab, von dem abfiltriert wird. Das so erhaltene Filtrat verwandelt man durch Schwefelwasserstoff in eine Lösung von Chloriden, welche man einengt und mit 30%iger Goldchloridlösung fraktioniert fällt. Die letzten Fraktionen werden vor weiterer Zugabe von Goldchlorid erst bei mäßiger Temperatur eingeengt. Namentlich in der zweiten Fraktion findet man das Goldsalz des Neosins, es ist nur in geringer Menge vorhanden. In den vier letzten Fraktionen aber tritt das Goldsalz des Carnitins auf.

Das Vitiatin gewinnt man, wenn man das Filtrat der mit alkoholischem Platinchlorid erzeugten Fällung durch Abdampfen vom Alkohol befreit und mit Wasser aufnimmt. Dann wird Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet, vom Schwefelplatin abgesaugt und das Filtrat eingeengt. Man fällt dies jetzt mit 30%iger Goldchloridlösung, worauf nach längerem Stehen das Vitiatinchloraurat in gelbroten Platten auskristallisiert.

Das Filtrat der Quecksilberfällung I versetzt man jetzt abwechselnd mit alkoholischer Quecksilberchlorid- und alkoholischer Natriumacetatlösung, bis keines der Fällungsmittel mehr einen Niederschlag erzeugt, saugt am anderen Tage ab und wäscht mit einem Gemisch von alkoholischer Quecksilberchlorid- und alkoholischer Natriumacetatlösung aus. Diese Quecksilberfällung II enthält Histidin, Methylguanidin und β-Alanin und manchmal wahrscheinlich auch Dimethylguanidin. Um sie voneinander zu trennen, muß die Quecksilberfällung II durch Abdunsten vom Alkohol befreit und dann nach dem Lösen in salzsaurem Wasser mit Schwefelwasserstoff zersetzt werden. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber engt man zum Sirup ein, worauf sich Kristalle von Histidindichlorid und etwas Natriumchlorid ausscheiden. Man saugt sie ab, wäscht sie mit absolutem Alkohol und digeriert sie dann mehrmals mit jedesmal neuen Mengen warmen Methylalkohols, in dem das Kochsalz unlöslich, die Chloride des Histidins aber löslich sind. Die methylalkoholische Lösung dampft man zur Trockne ein und dampft sie dann noch mehrmals mit konzentrierter Salzsäure ab, um das Monochlorid des Histidins sicher vollständig in das Dichlorid zu verwandeln. Schließlich wird nach Zugabe von absolutem Alkohol das Dichlorid kristallinisch abgeschieden, abgesaugt und mit absolutem Alkohol gewaschen. Zur Beseitigung der hartnäckig anhaftenden anorganischen Verunreinigungen wird es dann noch mehrmals aus heißer konzentrierter Salzsäure umkristallisiert und schließlich rein gewonnen.

Das Filtrat des Histidinchlorides engt man zum Sirup ein und nimmt diesen nochmals mit absolutem Alkohol auf. Hierbei bleibt noch eine beträchtliche Menge Histidinchlorid ungelöst zurück. Das Filtrat hiervon wird mit alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt, von der Fällung dekantiert und diese mit Alkohol gut ausgewaschen. Die Platinfällung enthält neben Ammoniumchlorid noch reichlich Histidin, das aber aus der alkoholischen Lösung als Histidinchlorid auskristallisiert, nicht aber als Platinverbindung, da eine schwer lösliche Platinverbindung des Histidins nicht existiert.

Das Filtrat der Platinfällung wird abgedampft, mit heißem Wasser aufgenommen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Platinsulfid engt man auf dem Wasserbade zum Sirup ein und nimmt diesen mit absolutem Alkohol auf. Hierauf scheiden sich nochmals 2 *g* salzsaures Histidin aus. Das Filtrat hiervon wird jetzt mit heiß gesättigter alkoholischer Cadmiumchloridlösung versetzt und außerdem fein gepulvertes Cadmiumchlorid eingetragen. Die so erhaltene Cadmiumfällung I saugt man ab und wäscht sie mit kalter alkoholischer Cadmiumchloridlösung nach. Man nimmt sie dann nach dem Abdampfen des Alkohols mit heißem Wasser auf, schlägt das Metall durch Schwefelwasserstoff nieder, läßt abkühlen und filtriert. Das Filtrat des Cadmiumsulfides wird zum Sirup eingeengt und mit absolutem Alkohol aufgenommen, wobei etwas anorganische Substanz ungelöst zurückbleibt. Von ihr wird abgesaugt, das alkoholische Filtrat durch Abdampfen vom Alkohol befreit und nun mit 30%iger Goldchloridlösung gefällt. Es scheidet sich Methylguanidinchloraurat als ein Öl ab, das erst nach mehrtägigem Stehen unter dem Exsikkator kristallinisch erstarrt. Beim Umkristallisieren dieses Salzes finden sich gelegentlich Goldwerte, die zu Dimethylguanidinchloraurat stimmen, doch ist das Vorkommen des Dimethylguanidins im Fleischextrakt von *Kutscher* und *Engeland* noch nicht ganz sicher erwiesen; die Reindarstellung des Körpers macht hier Schwierigkeiten, da eine bequeme Trennungsmethode von Methylguanidin und Dimethylguanidin bisher nicht existiert und die Salze der beiden Körper sich sehr ähnlich verhalten.

Das Filtrat von Cadmiumfällung I liefert durch abwechselnde Fällung mit alkoholischer Natriumacetat- und alkoholischer Cadmiumchloridlösung die Cadmiumfällung II. Man wäscht sie mit einem Gemenge beider Fällungsmittel und stellt aus ihr genau so wie aus Cadmiumfällung I eine Lösung von Chloriden dar, welche jetzt abgedampft und mit absolutem Alkohol vom Kochsalz befreit wird. Sie enthält β-Alanin; da dieser Körper auch in den Mutterlaugen des Methylguanidinchloraurates aus Cadmiumfällung I enthalten ist, beseitigt man aus diesen das Gold durch Schwefelwasserstoff und vereinigt das Filtrat des Schwefelgoldes mit der aus Cadmiumfällung II stammenden Flüssigkeit. Das Gemenge der beiden wird stark eingeengt und mit alkoholischer Platinchloridlösung versetzt. Die Masse wird bei gewöhnlicher Temperatur verdampfen gelassen, wobei sie kristallinisch erstarrt. Man saugt die Kristalle ab und wäscht sie mit wenig konzentrierter Salzsäure, um sie dann in wenig warmes Wasser einzutragen. Vom schwer

löslichen Ammoniumplatinat wird abfiltriert und dann eingeengt, bis alles kristallisiert. Dann wird abfiltriert und aus heißer konzentrierter Salzsäure umkristallisiert, worauf man reines β-Alaninplatinat vor sich hat.

Von den drei bisher geschilderten Methoden ist die erste mit ganz besonderem Erfolg auch bei der Untersuchung des Muskelextraktes von Fischen und Krabben zur Anwendung gekommen. Da die hierbei gefundenen Basen zum großen Teil ganz andere sind wie die des Rindermuskels, möge hier noch eine Schilderung der Aufteilung des Krabbenextraktes folgen.

4. Methode von Kutscher, angewandt auf Krabbenextrakt.[1])

(Gewinnung von Arginin, Lysin, Betain, Crangitin, Methylpyridylammoniumhydroxyd, Neosin, Crangonin.)

2 *kg* käuflicher Krabbenextrakt[2]) werden in 4 *l* Wasser gut verrührt. Nach einiger Zeit hat sich der größte Teil gelöst; jedoch bleibt am Boden ein rötliches feinkörniges Sediment von Tyrosin, von welchem man abgießt. Man wäscht dasselbe dann zweimal auf der Zentrifuge mit etwas Wasser aus und gibt die Waschwässer zu dem Hauptteil der Flüssigkeit. Die nun folgende Verarbeitung mit Tannin, Baryt und Blei ist völlig gleich derjenigen, welche auf S. 1044 u. 1045 geschildert worden ist. Die Flüssigkeit, welche man schließlich nach Behandlung mit frisch gefälltem Bleioxyd erhält, wird zum Sirup eingedampft, worauf sich Kristalle von Leucin und Tyrosin ausscheiden.[3]) Nach 12 Stunden saugt man von diesen scharf ab, wäscht sie mit möglichst wenig kaltem Wasser gut aus und stellt sie zur Seite. Das Filtrat wird abweichend von dem beim Fleischextrakt gewählten Wege jetzt erst noch einer Fällung mit Phosphorwolframsäure unterzogen und zu dem Zwecke auf einen Gehalt von 5% Schwefelsäure gebracht. Man läßt die Fällung bis zum anderen Tage stehen, saugt sie ab und stellt daraus genau in der auf S. 1007 angegebenen Weise durch Baryt und nachfolgende Behandlung mit Kohlensäure eine Lösung der freien Basen dar, welche stark eingeengt und mit Salpetersäure schwach angesäuert wird, worauf man daraus unter Benutzung von Silbernitrat und von Silbernitrat und Baryt drei verschiedene Silberniederschläge auf völlig demselben Wege herstellt, wie auf S. 1045 u. 1046 geschildert ist.

Der Silberniederschlag I enthält Purinbasen (im Falle des Krabbenextraktes, des Lachses und des getrockneten Bonito[4]) Hypoxanthin), die nach den dafür üblichen, an einer anderen Stelle dieses Werkes geschilderten Methoden isoliert werden.

[1]) *D. Ackermann* und *F. Kutscher,* Über Krabbenextrakt. 4. Mitteilungen. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. **13**. S. 180, 610. Bd. **14**. S. 687 (1907).

[2]) Der Krabbenextrakt wird aus einem kleinen, langschwänzigen Krebs, der Nordseegranele (Crango vulgaris) dargestellt.

[3]) Kreatin und Kreatinin kommt hier nicht zur Ausscheidung, weil der Krabbenextrakt diese Körper nicht enthält.

[4]) *M. Suzuki, K. Joshimura, M. Jamakawa* und *J. Irie,* Über die Extraktivstoffe des Fischfleisches. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **62**. S. 1 (1909).

Der Silberniederschlag II des Krabbenextraktes ist noch nicht untersucht. Im Falle des frischen Fleisches von Bonito, Maguro, Lachs und Hummer[1]) wurde darin Histidin gefunden, das man als Chlorid oder Pikrolonat isolieren kann.[2])

Der Silberniederschlag III enthielt beim frischen Hummerfleisch und beim Krabbenextrakt Arginin.[2]) Das Fehlen von Methylguanidin wurde in letzterem Falle erwiesen. Da das Methylguanidin aber bei Verarbeitung des Rindfleischextraktes im Silberniederschlag III auftritt, so soll hier geschildert werden, wie die Trennung des Methylguanidins vom Arginin versucht werden müßte, wenn im Falle der Verarbeitung eines Extraktes anderer Herkunft beide einmal gleichzeitig nebeneinander in dieser Fraktion auftreten sollten. Man zersetzt den Silberniederschlag III, nachdem man ihn in schwefelsaurem Wasser aufgenommen hat, mit Schwefelwasserstoff, saugt vom Schwefelsilber ab, wäscht dies gut aus und fällt nach vorherigem Einengen des mit dem Waschwasser vereinigten Filtrates mit Phosphorwolframsäure. Der Niederschlag wird am anderen Tage abgesaugt und in bekannter Weise (siehe S. 1007) durch Baryt und Kohlensäure in eine Lösung der kohlensauren Basen verwandelt. Diese macht man mit Salpetersäure schwach sauer, erhitzt und gibt dann solange kohlensaures Kupfer hinzu, als sich nichts mehr davon löst. Dann kocht man 5 Minuten, saugt vom überschüssigen kohlensauren Kupfer ab und engt das schön blaue Filtrat stark ein. Es erscheinen dann, besonders nach dem Impfen mit etwas Argininkupfernitrat, nach einiger Zeit schöne Kristalle dieses Salzes. Man muß 1—2 Tage warten, bis alles möglichst auskristallisiert ist, dann saugt man vom Argininkupfernitrat ab, das nach dem Umkristallisieren aus kochendem Wasser analysiert werden kann. Um eventuell vorhandenes Methylguanidin zu fassen, muß man das Filtrat des Argininkupfernitrates mit Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreien, das Filtrat vom Schwefelkupfer mit Phosphorwolframsäure fällen und kann nun nach Überführung dieses Phosphorwolframsäureniederschlages in die kohlensaure Basenlösung entweder diese mit wässeriger Pikrolonsäurebildung versetzen, worauf sich das schwer lösliche Methylguanidinpikrolonat ausscheiden muß, oder man macht die kohlensaure Lösung salzsauer, engt sie stark ein und fällt sie dann mit 30%iger Goldchloridlösung; es muß dann ein Niederschlag von Methylguanidinchloraurat entstehen. Auch das schwerlösliche Pikrat des Methylguanidins läßt sich zur Isolierung und Trennung vom Arginin gut verwerten.

Das Filtrat vom Silberniederschlag III enthält nun noch eine Reihe von Basen, deren Isolierung in folgender Weise gelingt. Man beseitigt aus der Flüssigkeit das Silber durch Zugabe von Salzsäure und den Baryt durch Schwefelsäure, filtriert vom Chlorsilber und Baryumsulfat ab

[1]) *M. Suzuki, K. Joshimura, M. Jamakawa* und *J. Irie*, Über die Extraktivstoffe des Fischfleisches. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62. S. 1 (1906).

[2]) Das Nähere siehe in dem von *H. Steudel* bearbeiteten Kapitel dieses Werkes: „Isolierung von Histidin, Arginin und Lysin."

und fällt das Filtrat, nachdem man es auf einen Gehalt von ungefähr 5% Schwefelsäure gebracht hat, mit Phosphorwolframsäure.

Der Niederschlag wird am anderen Tage abgesaugt und muß solange gewaschen werden, bis das Waschwasser keine Salpetersäure mehr enthält. Dann stellt man durch Behandeln des Niederschlages mit Baryt und Kohlensäure (das Nähere siehe S. 1007) eine Lösung der kohlensauren Basen her, die man zum Sirup eindampft. Diesen versetzt man jetzt mit gesättigter kalter alkoholischer Pikrinsäurelösung unter Vermeidung eines Überschusses, solange noch eine Fällung entsteht. Am anderen Tage saugt man ab, wäscht mit etwas Alkohol nach und löst die Fällung in kochendem Wasser auf. Hierauf läßt man einige Stunden in der Kälte stehen, filtriert die reichlichen Kristalle, die sich abgeschieden haben, ab und wäscht sie mit etwas Alkohol. Sie bestehen aus dem analysenreinen Pikrat[1]) des d-Lysins.

Die erste (alkoholische Mutterlauge der Pikrinsäurefällung wird auf dem Wasserbad vom Alkohol befreit, worauf man den so erhaltenen Rückstand mit der zweiten (wässerigen) Mutterlauge des Lysinpikrates vereinigt. Dieses Gemenge wird jetzt eventuell unter Zugabe von Wasser durch Aufkochen zur Lösung gebracht; zur kochenden Lösung gibt man dann solange konzentrierte Salzsäure, als kein Niederschlag von Pikrinsäure mehr dadurch erzeugt wird. Läßt man dann abkühlen, so hat sich noch mehr Pikrinsäure ausgeschieden. Man saugt nun ab, wäscht mit 10%iger Salzsäure aus und gibt das Filtrat mit den Waschwässern zusammen in einen großen Scheidetrichter, in dem man es durch zwei- bis dreimal wiederholtes Ausschütteln von dem Rest der Pikrinsäure befreit. Hierauf dunstet man auf dem Wasserbade bei niederer Temperatur zunächst den Äther ab, dann die ganze Flüssigkeit (zuletzt unter dem Abzug) vollständig zum Sirup ein und läßt ihn 24 Stunden in der Kälte stehen. Nach dieser Zeit haben sich reichlich Kristalle ausgeschieden, die in kaltem absoluten Alkohol schwer löslich sind. Deshalb verreibt man dieselben mitsamt ihrer Mutterlauge mit absolutem Alkohol, saugt ab, wäscht mit absolutem Alkohol etwas nach und erhält so analysenreines, weißes Betainchlorid, das man bequem identifizieren kann, indem man einen Teil desselben in wenig Wasser löst und die Lösung mit 30%iger wässeriger Goldchloridlösung versetzt, worauf sich das schöne Goldsalz des Betains ausscheidet.

Die alkoholische Mutterlauge des Betainchlorides wird etwas eingeengt und nun mit heiß gesättigter alkoholischer Quecksilberchloridlösung gefällt. Die reichliche kristallinische Fällung saugt man frühestens am anderen Tage ab, wäscht sie mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung aus und löst den Niederschlag, nachdem man den Alkohol durch Abdunsten von ihm abgetrieben hat, in heißem Wasser. Jetzt wird Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet, vom Schwefelquecksilber abfiltriert und die Lösung der Chloride zum Sirup eingeengt. Den teilweise kristallinischen Rückstand

[1]) Aus 2 *kg* Krabbenextrakt kann man nicht weniger wie 63 *g* davon erhalten.

nimmt man mit absolutem Alkohol auf, wodurch noch etwas Betainchlorid gewonnen wird, den davon ablaufenden Alkohol engt man jetzt wieder zum Sirup ein und nimmt wieder mit Alkohol auf. Auch hierbei scheiden sich weiße Kristalle aus, dieselben sind aber kein Betainchlorid mehr, sondern sie bestehen aus dem Chloride des Crangitins. Um dasselbe zu identifizieren, führt man das Chlorid durch Lösen in wenig Wasser und Zugabe von 30%iger Goldchloridlösung in das schwer lösliche Goldsalz $C_{13}H_{20}N_2O_4 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$ vom Schmelzpunkt 162—165° über.

Das alkoholische Filtrat vom Crangitinchlorid wird nun mit 20%iger alkoholischer Platinchloridlösung versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Nach längerem Stehen saugt man die voluminöse Fällung ab und wäscht sie mit absolutem Alkohol, bis derselbe fast farblos abläuft. Diese Fällung enthält (beim Krabbenextrakt) die Platinate des Methylpyridylammoniumhydroxyds des Neosins und des Crangonins. Um sie voneinander zu trennen, kristallisiert man sie jetzt aus kochendem, salzsaurem Wasser um. Nach dem Einengen der wässerigen Lösung bei gelinder Temperatur scheidet sich das ziemlich schwer lösliche Platinat des Methylpyridylammoniumhydroxydes in glänzenden lachsfarbenen Platten ab. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser ist der Körper rein. Die erste wässerige Mutterlauge des Platinates des Methylpyridylammoniumhydroxyds muß jetzt durch Schwefelwasserstoff zersetzt werden; man saugt vom Schwefelplatin ab, engt die so erhaltene Lösung der Chloride ein und fällt sie nun mit 30%iger Goldchloridlösung vollständig aus. Die reichliche Fällung filtriert man nach einigen Tagen ab, löst sie in möglichst wenig siedender, verdünnter Salzsäure vollständig auf und engt die Lösung bei gelinder Temperatur etwa auf die Hälfte ihres Volumens ein. Es scheidet sich jetzt schon in der Wärme nochmals Methylpyridylammoniumhydroxyd in Form seines auch in warmem Wasser schwer löslichen Goldsalzes aus, von dem man abfiltriert. Man hat auf diese Weise von dieser Base fast nichts mehr im Filtrat. Dasselbe engt man jetzt weiter bei zirka 60° ein, und zwar auf die Hälfte seines Volumens, läßt abkühlen und bekommt nun eine kristallinische Ausscheidung vom Chloraurate des Neosins.[1]) Während nun die Isolierung des Methylpyridins und Neosins auf die geschilderte Weise ziemlich leicht gelingt, ist die Reindarstellung der dritten Base, des Crangonins, viel schwieriger. Man engt, um sie zu bekommen, die Mutterlauge des Neosinchloraurates vorsichtig ein und erhält schließlich ein gelbrotes Öl, das nach einigen Tagen zu Drusen von kurzen Nadeln erstarrt. Beim Umkristallisieren zeigen diese nun eine starke Neigung, metallisches Gold abzusetzen und schließen außerdem hartnäckig etwas Neosingold ein. Man geht am besten so vor, daß man die Kristalle mit wenig heißem Wasser löst, bei geringer Temperatur solange einengt, bis sich an der Oberfläche der Flüssigkeit Nädelchen zeigen. Dann kühlt man ab, filtriert und dampft das Filtrat weiter ein. Haben die jetzt sich ausscheidenden Kristalle

[1]) Aus 2 *kg* Krabbenextrakt lassen sich 4 *g* Neosingoldchlorid gewinnen, doch fand sich in einer anderen Extraktportion weniger.

nach dem Absaugen und Trocknen noch nicht den Goldwert des Crangoninchloraurates, so muß man dieselbe Prozedur nochmals wiederholen, bis man ein reines Salz dieser Base hat.

In der nun folgenden kurzen Übersicht über die bisher bekannten Fleischbasen sind dieselben nach steigender Zahl ihrer C-Atome geordnet.[1])

Methylguanidin, $C_2H_7N_3$, wurde zuerst von *Brieger*[2]) aus faulem Pferdefleisch und aus Cholerakulturen auf Rindfleischbrei gewonnen, dann von *Kutscher*[3]) und später von *Gulewitsch*[4]) aus *Liebigs* Fleischextrakt erhalten. *Krimberg*[5]) stellte die Base aus frischem Rindfleisch dar. Die Verbindungen der Base siehe in dem von *Fr. Kutscher* behandelten Abschnitt über Harnbasen. Die Darstellung kann nach den drei ersten der oben geschilderten Verfahren geschehen.

β-Alanin, $C_3H_7NO_2$, wurde aus *Liebigs* Fleischextrakt von *Engeland* isoliert.[6])

Chloroplatinat, $(C_3H_7NO_2)_2 . 2HCl . PtCl_4$, zersetzt sich bei 188°, unterscheidet sich vom isomeren Sarkosinplatinat durch das Fehlen von Kristallwasser und die Kristallform, denn es kristallisiert aus Alkohol. Wasser und Salzsäure in schönen dunkelgelben Nädelchen. In diesen drei Lösungsmitteln ist es leicht löslich.

Von *Micko*[7]) ist aus Fleischextrakt ein Alanin gewonnen, von dem der Entdecker aber nicht angibt, ob es β- oder α-Alanin ist.

Dimethylguanidin, $C_3H_9N_3$.[8])

Trimethylaminoxyd, C_3H_9NO, wurde in allerneuester Zeit zum ersten Male aus den Muskeln des Dornhais (Acanthias vulgaris) in *Kutschers*[9]) Laboratorium dargestellt.

Besonders geeignet zu seiner Isolierung ist neben dem Pikrat das Chloraurat, $C_3H_9NO . HCl . AuCl_3$, welches in kaltem Wasser schwer, in

[1]) Histidin, Arginin, Lysin, Cholin und Neurin sowie die Purinbasen finden an dieser Stelle keine Berücksichtigung.

[2]) *L. Brieger*, Über Ptomaine. III. S. 34. Berlin 1886. Hirschwald. — Derselbe, Zur Kenntnis der Stoffwechselprodukte des Cholerabazillus. Berliner klin. Wochenschr. Jg. 1887. S. 817.

[3]) *Fr. Kutscher*, Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. **10**. S. 528 (1905).

[4]) *Wl. Gulewitsch*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **47**. S. 471 (1906).

[5]) *R. Krimberg*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 412 (1906).

[6]) *R. Engeland*, Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. **16**. S. 663 (1908).

[7]) *K. Micko*, Über das Vorkommen von Monaminosäuren im Fleischextrakt. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **56**. S. 180 (1908).

[8]) Siehe hierüber den von *Fr. Kutscher* behandelten Abschnitt über Harnbasen.

[9]) *A. Suwa*, Untersuchungen über die Extraktstoffe des Fischfleisches. Zentralbl. f. Physiol. Bd. **22**. S. 307 (1908). — Derselbe, Untersuchungen über die Organextrakte der Selachier. *Pflügers* Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. **128**. S. 421 (1909) und Bd. **129**. S. 231 (1909).

heißem Wasser leicht löslich ist. Der Schmelzpunkt wird von verschiedenen Autoren verschieden angegeben.

Chloroplatinat, $(C_3H_9NO)_2 . 2HCl . PtCl_4$ schmilzt bei 214°. Glänzende rhombische Plättchen.

Pikrat, $C_3H_9NO . C_6H_2(NO_2)_3 . OH$, sehr geeignet zur Isolierung, da es in Äthylalkohol und kaltem Wasser schwer löslich ist. Schmelzpunkt 197°.

Chlorid, $C_3H_9NO . HCl$, schmilzt bei 205—210° unter Zersetzung.

Quecksilberverbindung, $C_3H_9NO . HCl . 4HgCl_2 + H_2O$.

Cadmiumverbindung, $C_3H_9NO . HCl . CdCl_2$. In Wasser leicht löslich, in Alkohol schwer löslich.

Die Isolierung des Trimethylaminoxydes gelingt mit dem oben geschilderten vierten Verfahren.

20 *kg* ganz frische Dornhaie werden von Köpfen, Schwänzen und Eingeweiden befreit und mit der Fleischhackemaschine zerkleinert, dann mit der doppelten Menge kochendem Wasser dreimal ausgezogen; die wässerigen Extrakte engt man auf freier Flamme stark ein und geht nun genau so vor, wie bei der Aufteilung des Krabbenextraktes geschildert wurde. Man erhält dann in dem durch alkoholische Pikrinsäure erzeugten Niederschlag nicht Lysin, wie beim Krabbenextrakt, sondern Trimethylaminoxyd, und zwar in außerordentlich großer Ausbeute, so daß man nach dem Umwandeln des Pikrates in das Chlorid nicht weniger, wie 20 *g* reines, weißes Trimethylaminoxydchlorhydrat (aus 23 *kg* Ausgangsmaterial) vor sich hat. — Zur Identifizierung führt man am besten einen kleinen Teil davon in das Chloraurat über.

Aus dem Filtrate der Pikrinsäurefällung gewinnt man in genau derselben Weise wie beim Krabbenextrakt Betain.

Kreatinin, $C_4H_7N_3O$, scheint im frischen Muskel der höheren Tiere konstant, aber in äußerst geringen Mengen vorzukommen. Bei einigen Fischen dagegen hat es *Krukenberg* [1]) in sehr bedeutenden Quantitäten nachgewiesen, so bei Luvarus, Pelamys, Conger. Im Krabbenextrakt [2]) wurde es ebenso wie das Kreatin vermißt.

Das mit den oben geschilderten Methoden aus Rindermuskelextrakt gewonnene Kreatinin ist fast ganz auf Umwandlung des Kreatins in Kreatinin während der Gewinnung und Verarbeitung des Extraktes zurückzuführen.

Das Kreatinin bildet gut kristallisierende Salze, von denen hier nur die für seine Darstellung verwertbaren kurz angeführt seien.

Kreatinin-Chlorzink $(C_4H_2N_3O)_2 . ZnCl_2$. Dasselbe wird gewonnen, indem man zu einer ziemlich stark eingeengten, alkoholischen oder wässerigen Lösung, welche das Kreatinin enthält, eine neutrale, konzentrierte, alkoholische Lösung von Chlorzink hinzugibt. Nach einiger Zeit scheidet

[1]) *C. Fr. W. Krukenberg,* Untersuchungen der Fleischextrakte verschiedener Fische. Untersuchungen aus d. physiol. Institut zu Heidelberg. Bd. 4. S. 43 u. 44 (1881).

[2]) *D. Ackermann* und *F. Kutscher,* Über Krabbenextrakt. Zeitschr. f. Untersuchungen d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. 13. S. 183 (1907).

sich die Verbindung als Kristallpulver ab. Nach 2—3 Tagen, wenn sich dessen Menge nicht mehr vermehrt, filtriert man ab und wäscht den Niederschlag mit Weingeist aus. Man kann die Verbindung dann durch Lösen in heißem Wasser umkristallisieren; in kaltem Wasser ist sie schwer löslich. Will man aber Kreatinin daraus frei machen, so löst man die Verbindung in heißem Wasser auf und zersetzt sie durch halbstündiges Kochen mit überschüssigem Bleioxydhydrat oder kohlensaurem Bleioxyd. Dann filtriert man heiß ab, entfärbt das Filtrat durch Tierkohle, filtriert wieder und dampft stark ein, worauf das Kreatinin in farblosen Prismen auskristallisiert.

Das Kreatininchlorzink löst sich leicht in Salzsäure und wird aus dieser Lösung durch Natriumacetat wieder gefällt.

Chlorid, $C_4H_7N_3O . HCl$, aus Wasser langsam umkristallisiert, enthält das Salz 1 Molekül Kristallwasser. Es ist leicht löslich in Wasser, etwas schwieriger in Alkohol.

Platinat, $(C_4H_7N_3O)_2 . 2HCl . PtCl_4$, orangerote Prismen und Nadeln, leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol. Kristallisiert aus Wasser mit 2 Molekülen Kristallwasser.

Chloraurat, $C_4H_7N_3O . HCl . AuCl_3$. Ziemlich leicht löslich in Wasser und in Alkohol. Schmelzpunkt 170—174°.

Pikrat, $C_4H_7N_3O . C_6H_3N_3O_7$. Schwer lösliche Verbindung, die wohl neben dem Kreatininchlorid am besten geeignet sein dürfte, größere Mengen Kreatinin zu isolieren und zu reinigen. Schmelzpunkt 212—213°.

Für die Darstellung des Kreatinins aus Fleischextrakt ist vor allem die von *Kutscher*[1]) gemachte Beobachtung wichtig, daß es auf Zusatz von Silbernitrat und vorsichtige Zugabe von Ammoniak unter Vermeidung eines Überschusses (ebenso wie das Histidin und Carnosin) niedergeschlagen wird. Bedeutungsvoll ist ferner die Tatsache, daß dieser Niederschlag auch durch überschüssiges Barytwasser teilweise wieder gelöst werden kann. Der Gang der Darstellung nach *Kutscher* ist auf S. 1045 und 1046 bereits geschildert worden. *Krukenberg* machte die Beobachtung, daß Kreatinin nicht leicht aus Muskelmassen mit kaltem Alkohol zu extrahieren ist, wohl aber durch Kochen damit.

Isolierung von Kreatinin aus Fischmuskulatur nach Krukenberg.

1½ *kg* frisches Fischfleisch (Luvarus imperialis ist besonders reich an Kreatinin) wird fein zerschnitten und sofort in starken Alkohol[2]) getan; man kocht auf, gießt den Alkohol ab und kocht mit neuen Mengen Alkohol aus. Die vereinigten alkoholischen Auszüge werden durch Abdampfen vom Alkohol befreit, worauf man den Rückstand mit Äther durchschüttelt, um ihn zu entfetten. Ist dies geschehen, so scheiden sich bereits perl-

[1]) *Fr. Kutscher*, Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. **10**. S. 528 (1905).

[2]) Die Konzentration findet sich nicht genauer angegeben.

mutterglänzende, schwach bräunlich gefärbte Flitterchen von Kreatinin ab, die man durch Überführen in die Chlorzinkverbindung reinigen kann. (Aus $1^1/_2$ *kg* Fleisch von Luvarus imperialis gewann *Krukenberg* auf diese Weise 5 *g* kristallisiertes Kreatinin.)

Man kommt nicht selten in die Lage, Kreatin vom Kreatinin trennen zu müssen und geht dann am besten auf folgende Weise vor.

Trennung des Kreatins vom Kreatinin.[1])

Das Gemenge der Körper wird zum Sirup eingedampft, der Sirup stehen gelassen, bis die Kristallisation möglichst vollständig geworden ist, und nun mit absolutem Alkohol, in dem das Kreatin schwer löslich, das Kreatinin ziemlich leicht löslich ist, die Trennung vollzogen. Man bekommt beim Absaugen dann das Kreatin auf das Filter, während man das Kreatinin aus dem Filtrat durch Fällen mit Äther erhält.

Kreatin, $C_4H_9N_3O_2$, wurde von *Chevreul* (1835) entdeckt und findet sich konstant in den Muskeln der höheren Tiere.

Das Kreatin muß als solches isoliert werden, da es keine zur Isolierung geeignete schwer lösliche Verbindung desselben gibt. Es kristallisiert aus wässeriger Lösung in durchsichtigen harten Kristallen mit 1 Molekül Kristallwasser, welches schon bei 100° verfliegt. Hierbei werden die Kristalle undurchsichtig.

Isolierung des Kreatins nach Liebig.[2])

5 *kg* von Sehnen und Fett befreites Fleisch (die beste Ausbeute liefert das Fleisch des Wildes und der Hühner) werden zerkleinert und in zwei gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte übergießt man mit 2500 cm^3 Wasser, knetet die Mischung mit den Händen sorgfältig durch und preßt sie in einem Sack von grober Leinwand möglichst vollständig aus. Der einmal gepreßte Rückstand wird mit 2500 cm^3 Wasser von neuem sorgfältig gemischt und wieder ausgepreßt. Die Flüssigkeit der ersten Pressung wird zur weiteren Bearbeitung zur Seite gestellt, die der zweiten Pressung dient zur Ausziehung der anderen Hälfte des frischen Fleisches. Man behandelt in gleicher Weise die erste Hälfte mit 2500 cm^3 Wasser zum drittenmal und benutzt die durch Pressung erhaltene Flüssigkeit zur zweiten Ausziehung der anderen Hälfte. Die letztere wird zum drittenmal mit reinem Wasser aufquellen gelassen und ebenfalls gepreßt. Die vereinigten, nochmals durch ein reines Tuch geseihten Auszüge werden, um Eiweiß zu koagulieren, in einem großen Glaskolben im Wasserbad allmählich zum Sieden erhitzt, und zwar solange, bis eine herausgenommene Probe, für sich erhitzt, klar bleibt. Jetzt koliert man durch ein Tuch, filtriert noch einmal und gibt solange konzentriertes Barytwasser hinzu, als noch ein

[1]) Persönliche Mitteilung von *Kutscher* und *Steudel*.

[2]) *J. Liebig*, Chemische Untersuchungen über das Fleisch etc. Heidelberg. C. F. Winter. 1847. S. 22 ff.

Niederschlag (von Baryumphosphat und Magnesiumphosphat) entsteht.[1]) Jetzt wird abfiltriert, und das Filtrat vorsichtig (so daß es nie auf Kochhitze kommt) eingeengt zu etwa $^1/_{20}$ seines Volumens. Dann stellt man den dünnen Sirup an einen warmen Ort und läßt ihn freiwillig weiter abdunsten, worauf das Kreatin auskristallisiert. Nach längerem Stehen in der Kälte wird das Kreatin von der Mutterlauge durch Filtrieren getrennt, mit Wasser und zuletzt mit Weingeist gewaschen und dann noch einmal durch Kochen mit Tierkohle gereinigt. Es scheidet sich dann aus dem von der Tierkohle ablaufenden Filtrat nach dem Einengen das Kreatin in vollkommen reinen Kristallen ab.

Isolierung des Kreatins[2]) (neuere Methode).

500 *g* möglichst von Fett und Sehnen befreites und in der Wurstmaschine zerkleinertes Fleisch werden, mit $^1/_2$ *l* Wasser gut durchgerührt, im Wasserbade unter Umrühren mit einem Thermometer auf ca. 50—60° erwärmt, durch Leinen koliert, ausgepreßt und nochmals mit etwa der Hälfte Wasser ebenso behandelt. Die vereinigten Extrakte werden zur Koagulation des Eiweißes unter Umrühren über freiem Feuer aufgekocht, nach dem Erkalten filtriert, dann vorsichtig unter Vermeidung eines Überschusses mit Bleiessig gefällt, wieder filtriert und das Filtrat durch Schwefelwasserstoffgas entbleit. Das Filtrat vom Schwefelblei wird sodann auf dem Wasserbade bei mäßiger Wärme bis zum dünnen Sirup eingedampft und 2—3 Tage an einen kühlen Ort gestellt, wobei das Kreatin auskristallisiert. Dasselbe wird abfiltriert und mit 88%igem Alkohol ausgewaschen.

Betain, $C_5H_{11}NO_2$, wurde gefunden von *Brieger*[3]) in der Miesmuschel (Mytilus edulis); ferner im Krabbenextrakt von *D. Ackermann* und *F. Kutscher*.[4]) Im Muskelgewebe des Dornhais von *Kutschers* Schüler *Suwa*.[5])

Chlorid, $C_5H_{11}NO_2 . HCl$, ist in Wasser leicht löslich, in absolutem Alkohol unlöslich. Letztere Eigenschaft ist für die Gewinnung des Betains von großer Bedeutung. Schmelzpunkt 227—228°.

Chloraurat, $C_5H_{11}NO_2 . HCl . AuCl_3$. In kaltem Wasser schwer lösliches Salz, das sich zur Isolierung des Betains gleichfalls sehr gut eignet. Der Schmelzpunkt wird verschieden angegeben (209°, 224°, 230—235°).

Platinat, $(C_5H_{11}NO_2)_2 . 2HCl . PtCl_4$, schwer löslich in Alkohol, leicht löslich in Wasser; daraus mit wechselndem Kristallwassergehalt kristallisierend. Schmelzpunkt des wasserfreien Salzes 246°.

Das Quecksilbersalz ist in Wasser ziemlich leicht löslich, in Alkohol schwer löslich. Das Pikrat kaum löslich in Alkohol, leicht löslich dagegen in

---

[1]) Alkalische Reaktion schadet nichts.

[2]) *E. Drechsel*, Anleitung zur Darstellung physiologisch-chemischer Präparate. Bergmann. 1889. S. 29.

[3]) *L. Brieger*, Ptomaine. III. Berlin 1886. Hirschwald. S. 77.

[4]) *D. Ackermann* und *F. Kutscher*, Über Krabbenextrakt. II. u. IV. Mitteilung. Bd. **13**. S. 610 (1907); Bd. **14**. S. 688 (1907).

[5]) *A. Suwa*, Untersuchungen über die Organextrakte der Selachier. I. Mitteilung. *Pflügers* Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **128**. S. 421 (1909).

Wasser, eine Eigenschaft, dank derer man es vom Lysin trennen kann, dessen Pikrat auch in Wasser schwer löslich ist. Die Gewinnung des Betains aus Krabbenextrakt ist bereits S. 1057 geschildert; wir beschreiben jetzt noch die

Isolierung von Betain aus der Miesmuschel nach Brieger.

Die noch lebenden Weichtiere werden zerquetscht und mit schwach salzsäurehaltigem Wasser ausgekocht. Hierauf entfernt man die festen Bestandteile und dampft die zurückbleibende Flüssigkeit zum Sirup ein. Jetzt wird dieser wiederholt mit Alkohol extrahiert, wobei man den Rückstand jedesmal energisch durchknetet. Nun dampft man den Alkohol ab, nimmt den Rückstand mit Wasser auf und fällt mit Bleiacetat. Das Filtrat der Bleifällung wird durch Schwefelwasserstoff vom Metall befreit und eingeengt. Jetzt fällt man mit wässeriger Quecksilberchloridlösung, saugt den Niederschlag nach einiger Zeit ab, wäscht ihn und leitet in die vereinigten Filtrate Schwefelwasserstoff ein. Ist alles Quecksilber niedergeschlagen, so wird filtriert, das Filtrat zum Sirup eingedampft und nun mit warmem absoluten Alkohol digeriert. Die sich ausscheidenden weißen Kristalle sind Betainchlorid.

Vitiatin, $C_5H_{14}N_6$.[1]

Methylpyridylammoniumhydroxyd, C_6H_9NO.[1]

$C_6H_{14}N_2O_2$. Diese unbenannte Base konnte *Krimberg*[2] mit *Kutschers* Methode aus *Liebigs* Fleischextrakt gewinnen. Er stellte zu dem Zweck die Chloride der in Quecksilberfällung I (S. 1047) enthaltenden Basen dar, dampfte sie ein und nahm mit absolutem Alkohol auf. Die dabei in geringer Menge abgeschiedenen anorganischen Verbindungen wurden durch Absaugen beseitigt. Darauf fällte er das alkoholische Filtrat mit alkoholischer Platinchloridlösung unter Vermeidung eines Überschusses, saugte den Niederschlag am anderen Tage ab und wusch ihn mit Alkohol. Dann wurde der Niederschlag durch Aufnehmen mit 200 *cm*³ kaltem Wasser in einen in Wasser schwer löslichen Teil, der sich als Oblitinplatinat erwies, und in einem in Wasser leicht löslichen Teil getrennt. Die in Wasser leicht löslichen Platinate verwandelte er durch Schwefelwasserstoff in eine Lösung der Chloride, welche nun durch Goldchloridlösung auf folgende Weise fraktioniert zur Ausfällung kamen. Es wurden 20 *cm*³ 10%iger Goldchloridlösung zugegeben, der erhaltene Niederschlag abgesaugt und umkristallisiert; die beiden so erhaltenen Mutterlaugen wurden dann vereinigt, eingeengt, mit einer zweiten Portion 20 *cm*³ 10%iger Goldchloridlösung gefällt und so fortgefahren. — In den ersten fünf Fraktionen fand sich nun nur Carnitinchloraurat, aber in der sechsten und siebenten Fraktion wurde eine neue Verbindung der Formel $C_6H_{14}N_2O_2 . HCl . AuCl_3$

---

[1] Ist in dem von *Fr. Kutscher* bearbeiteten Teil über Harnbasen besprochen.

[2] *R. Krimberg*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie. X. Mitteilung. Bd. 55. S. 477 (1908).

isoliert, die nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser rein war; sie scheidet sich hierbei anfangs, ebenso wie das Carnitingold als ein Öl ab, welches erst beim völligen Erkalten kristallinisch wird; ihr Schmelzpunkt ist 126—128°. Der Körper hat die Formel des Lysins, ist aber weder mit dem bekannten *Drechsel*schen Eiweißspaltprodukt Lysin noch mit dem von *Winterstein* aus Rizinussamen isolierten Isomeren identisch.

Neosin, $C_6H_{17}NO_2$, wurde zum erstenmal von *Kutscher*[1]) aus *Liebigs* Fleischextrakt, dann von *Ackermann* und *Kutscher*[2]) aus Krabbenextrakt gewonnen. Die Base findet sich in den Extrakten in wechselnder Menge und fehlt manchmal ganz. Sie ist ein Trimethylaminderivat.

Das Chloraurat, $C_6H_{16}NOCl.AuCl_3$, ist in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem Wasser ziemlich leicht löslich. In absolutem Alkohol ist es leicht löslich. Bei 202—205° schmilzt es ohne Zersetzung zu einer roten, klaren Flüssigkeit, die beim Erkalten wieder zu einer hellgelben Kristallmasse erstarrt.

Carnin, $C_7H_8N_4O_3$. In *Liebigs* Fleischextrakt entdeckt von *Weidel*.[3]) *Krukenberg* und *Wagner*[4]) bestätigten die Angaben *Weidels*. Aus Pferdefleisch wurde das Carnin gewonnen von *Balke*.[5])

Das Carnin ist ein krümliger Kristallschlamm, der nach dem Trocknen kreidig und glanzlos ist. Es färbt sich bei 230° braun, um bei höherer Temperatur (ca. 239°) zu verkohlen. Es ist in kaltem Wasser schwer, in heißem leichter löslich. In Alkohol und in Äther ist es nahezu unlöslich. Die wässerige Lösung, welche neutral reagiert, liefert keinen Niederschlag mit neutralem essigsauren Blei, Pikrinsäure, Quecksilbernitrat, jedoch mit basischem Bleiacetat, vorausgesetzt, daß nicht ein neutrales Bleisalz in der Flüssigkeit gelöst ist, entsteht eine Fällung. Auch mit Platinchlorid ist eine Fällung ($C_7H_8N_4O_3.HCl.PtCl_4$) zu erhalten. Das Silbersalz $(C_7H_7AgN_4O_3)_2AgNO_3$ ist unlöslich in Salpetersäure, aber nicht ganz unlöslich in Ammoniak.

Haiser und *Wenzel*[6]) halten es für sehr wahrscheinlich, daß das Carnin ein äquimolekulares Gemenge von Inosin und Hypoxanthin ist. Sie konnten schon durch wiederholtes Verreiben mit kaltem Wasser und Eindampfen das Carnin zerlegen.

[1]) *Fr. Kutscher*, Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. **10**. S. 528 (1905).

[2]) *D. Ackermann* und *Fr. Kutscher*, Über Krabbenextrakt. IV. Mitteilung. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. **14**. S. 687 (1907).

[3]) *H. Weidel*, Über eine neue Basis aus dem Fleischextrakt. *Liebigs* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **158**. S. 352 (1871).

[4]) *C. Fr. W. Krukenberg* und *H. Wagner*, Zur Kenntnis des Carnins. Sitzungsberichte der physikal-medizin. Gesellschaft zu Würzburg. Jg. **1883**. S. 58.

[5]) *P. Balke*, Zur Kenntnis der Xanthinkörper. Journal f. prakt. Chem. (N. F.) Bd. **47**. S. 553 (1893).

[6]) *F. Haiser* und *F. Wenzel*, Über Carnin und Inosinsäure. Monatshefte f. Chemie Bd. **29**. S. 157 (1908).

Darstellung des Carnins nach Weidel.[1])

Die Lösung des Fleischextraktes in etwa 6 bis 7 Teilen warmen Wassers wird zunächst mit konzentriertem Barytwasser vorsichtig ausgefällt, so daß man einen Überschuß hinzuzubringen vermeidet. Entsteht in kleinen abfiltrierten Proben kein Niederschlag mehr, so trennt man durch ein leinenes Tuch von der Flüssigkeit, die man hierauf mit basisch-essigsaurem Blei nach dem Abkühlen völlig ausfällt. Der Niederschlag, der nun entsteht, ist von lichtbrauner Farbe, er wird abfiltriert, zwischen Leinwand in einer Schraubenpresse ausgepreßt, wieder mit viel Wasser zu einem Schlamm zerrieben und hierauf in einem großen emaillierten, eisernen Topf zum Kochen erhitzt. Man filtriert die Flüssigkeit und kocht den Rückstand noch mehrere Male aus. Das beim Abkühlen schon sich trübende Filtrat wird nun wieder bis zum Sieden erhitzt und mit einem starken Strom von Schwefelwasserstoff behandelt. Man trennt vom gebildeten Schwefelblei ab und dampft die nunmehr schon sehr entfärbte Flüssigkeit bis auf ein kleines Volumen ein.

Manchmal scheidet sich nun bei einigem Stehen schon ein Teil des Carnins in der Form eines krümligen, noch sehr gefärbten Kristallschlammes aus. Dies scheint von der im Extrakt vorhandenen wechselnden Kochsalzmenge und der dadurch mehr oder weniger großen Menge von Salzsäure abzuhängen, die durch Vermittlung des Chlorbleis nach diesen Operationen mit in die Flüssigkeit gelangen muß, in der sich das Carnin befindet. War eine solche Ausscheidung erfolgt, so trennt man sie und versetzt die übrige Flüssigkeit mit einer ziemlich konzentrierten Lösung von Silbernitrat, wodurch ein sehr voluminöser Niederschlag fällt. Man filtriert ihn ab, wäscht mit kaltem Wasser aus, rührt ihn nochmals zu einem Brei an und behandelt ihn mit Ätzammoniak, dem man ein gleiches Volumen Wasser zugesetzt hat. Das Chlorsilber geht in Lösung und man behält die in Ammoniak schwer lösliche Silberverbindung des Carnins zurück, die endlich nach dem Auswaschen in fast siedendes Wasser gegeben und mit Schwefelwasserstoff zersetzt wird. Die vom Schwefelsilber getrennte Flüssigkeit gibt nun beim Eindampfen wieder eine krümlige, kristallinische Ausscheidung von Rohcarnin, welches zum Schluß mit Tierkohle entfärbt wird. Diese letzte Reinigung schmälert ein wenig die Ausbeute, weil die Kohle außer dem Färbenden auch etwas Carnin zurückhält. Indessen entfärbt es sich leicht und aus der fast wasserhellen Flüssigkeit scheidet es sich bald beim Abkühlen in kreideweißen Drusen und krümligen Gruppen äußerst kleiner mikroskopischer, unregelmäßig begrenzter Kristalle aus. Man erhält aus dem Ausgangsmaterial etwa 10% Carnin.

Mit dieser Methode haben manche Forscher das Carnin auch nicht in Spuren erhalten können. Beispielsweise fand *Micko* statt Carnin stets nur Hypoxanthin. *Haiser* und *Wenzel* erklären dies auf sehr einfache Weise, gestützt auf ihre Beobachtung, daß das Carnin ein Gemisch von

[1]) *Weidel*, loc. cit.

Inosin und Hypoxanthin darstellt. Sie machen darauf aufmerksam, daß wohl das Carninsilber in Ammoniak schwer löslich ist, das Inosinsilber sich aber darin leicht löst. Aus dem nach *Weidels* Vorschrift hergestellten Silberniederschlag wird man also beim Auswaschen desselben mit Ammoniak nicht nur das Chlorsilber, sondern auch das Inosinsilber beseitigen, und wenn man genügend lange wäscht, nur noch Hypoxanthinsilber zurückbehalten, welches ja in Ammoniak unlöslich ist.

Darstellung des Carnins nach Haiser und Wenzel.

500 *g* möglichst frischer Fleischextrakt werden in zirka 5 Teilen warmen Wassers von ungefähr 40° gelöst und Barythydrat zugesetzt, bis kein Niederschlag erfolgt. Man scheue sich nicht davor, daß im Filtrate Baryt erscheint, sondern setze solange Baryt zu, als im Filtrate noch ein Niederschlag entsteht. Nach dem Absaugen des Barytniederschlages, der übrigens nach dem Auswaschen mit heißem Wasser nur Spuren von organischen Substanzen enthält, wird die stark alkalische Flüssigkeit mit Essigsäure neutralisiert. Sodann wird in der Kälte mit Bleiessig ausgefällt, indem man solange davon zusetzt, bis eben kein Niederschlag mehr entsteht. Ein Überschuß ist zu vermeiden, da dieser lösend auf den Niederschlag wirkt. Das Filtrat von dem mit kaltem Wasser gut ausgewaschenen Niederschlag, welcher inosinsaures Baryum enthält, fällt man jetzt mit Ammoniak, wobei abermals ein Bleiniederschlag entsteht, der das Carnin enthält. Dieser wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Dies kann in der Hitze vorgenommen werden, geschieht aber zweckmäßiger in der Kälte, damit etwa entstandene freie Säuren keine Zersetzung hervorrufen. Noch vor dem Abfiltrieren des Bleisulfids werden die Säuren mit Baryumkarbonat neutralisiert, hierauf wird filtriert und zum Sirup eingedampft. Nach dem Impfen mit Carninkristallen oder nach 24stündigem Stehen kommt die ganze Masse zur Kristallisation. Die Kristalle werden abgesaugt, kalt gewaschen und 3—4mal unter Eindampfen mit wenig Tierkohle aus Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 5—6 *g* pro 500 *g* frischen Fleischextrakt.

Darstellung des Carnins nach Balke.

Ca. 800 *g* feingehacktes Pferdefleisch, das von Sehnen und Fett möglichst befreit ist, wird mit dem gleichen Volumen Wasser bei 50—60° ungefähr eine Stunde auf dem Wasserbade unter gutem Umrühren digeriert, durch ein Koliertuch gepreßt und dann nochmals in der gleichen Weise mit ungefähr der Hälfte Wasser behandelt. Die vereinigten Filtrate werden dann behufs Koagulation der Eiweißkörper aufgekocht und nach dem Erkalten nochmals filtriert. Die klare, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit wird jetzt mit Natronlauge alkalisch gemacht, wodurch ein geringer Niederschlag von Phosphaten entsteht, den man abfiltriert. Das Filtrat wird nun mit salzsaurem Hydroxylamin versetzt und dann allmählich *Fehling*sche Lösung hinzugefügt. Es entsteht ein flockiger, gelbbrauner Niederschlag, den man zuerst durch Dekantieren mit einer Lösung von essigsaurem Natron auswäscht und dann filtriert. Man suspendiert diesen Niederschlag in Wasser, dem man etwas Ammoniak zugesetzt hat und zersetzt ihn dann mit Schwefelwasserstoff. Das eingedampfte Filtrat vom Schwefelkupfer wird ammoniakalisch gemacht

und hierauf mit Bleiessig versetzt. Es fallen die Bleiverbindungen des Carnins, Xanthins und Hypoxanthins vollständig aus. Der Bleiniederschlag wird abgesaugt und mehrere Male mit Wasser ausgekocht, wodurch die in heißem Wasser lösliche Carninbleiverbindung in den wässerigen Extrakt geht. Dies wird dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt und nach dem von *Weidel* angegebenen Verfahren weiter verarbeitet. Man erhält so 0·14 *g* Rohcarnin.

Carnitin, $C_7H_{15}NO_3$, wurde aus Fleischextrakt gewonnen von *Gulewitsch* und *Krimberg*.[1]) Die Darstellung ist oben geschildert.

Chlorplatinat, $(C_7H_{15}NO_3)_2 . 2HCl . PtCl_4$, schmilzt bei 214—218° unter Zersetzung.

Chloraurat, $C_7H_{15}NO_3HCl . AuCl_3$, bald kristallinisch werdendes Öl. Schmelzpunkt 153—154°.

Quecksilbersalze sind zwei bekannt. Aus der alkoholischen Lösung der freien Base scheidet sich auf Zusatz von alkoholischer Quecksilberchloridlösung $C_7H_{15}NO_3 . 2HgCl_2$ sofort kristallinisch ab, aus Lösungen, welche einen kleinen Überschuß von Salzsäure enthalten,

$$C_7H_{15}NO_3 . HCl . 6HgCl_2$$

als schwer kristallisierendes Öl. Die erstere ist in Wasser schwer löslich und schmilzt bei 204—205°. Es ist ein Trimethylaminderivat.

Carnosin, $C_9H_{14}N_4O_3$, wurde im Fleischextrakt von *Gulewitsch* und *Amiradžibi*[2]) entdeckt. Die freie Base kristallisiert in flachen Nädelchen, die in Wasser leicht und mit stark alkalischer Reaktion löslich sind, und bei 239° unter Zersetzung schmelzen. Bei der Spaltung mit Ätzbaryt entsteht Histidin.[3])

Nitrat, $C_9H_{14}N_4O_3 . HNO_3$, schmilzt bei 211—212°.

Die Darstellung ist S. 1046 u. 1050 geschildert.

Inosin, $C_{10}H_{12}N_4O_5$, entdeckt von *Haiser* und *Wenzel*[4]) als ein Bestandteil des Carnins, welches nach ihnen wahrscheinlich ein äquimolekulares Gemenge von Hypoxanthin und Inosin darstellt. Inosin schmilzt unscharf bei 215°. Es ist mehr wie zehnmal löslicher in Wasser als das Hypoxanthin und auch wesentlich leichter löslich als das Carnin. Beim Zusatz von Silbernitrat gestehen wässerige Inosinlösungen zu einer durchsichtigen Gallerte: das entstandene Silbersalz ist völlig unlöslich in Ammoniak.

Haiser und *Wenzel* gewannen das Inosin durch Acetylierung des Carnins und nachherige Verseifung des hierbei entstehenden Acetylinosins.

Darstellung des Inosins aus Carnin nach Haiser und Wenzel.

Carnin[5]) wird unter Zugabe eines Körnchens Natriumacetat mit Essigsäureanhydrid einmal aufgekocht und letzteres dann im Vakuum ab-

[1]) *Wl. Gulewitsch* und *R. Krimberg*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **45**. S. 326 (1905).

[2]) *Wl. Gulewitsch* und *S. Amiradžibi*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **30**. S. 565 (1900).

[3]) *Wl. Gulewitsch*, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. VIII. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **50**. S. 535 (1906/07).

[4]) *F. Haiser* und *F. Wenzel*, Über Carnin und Inosinsäure. I. Mitteilung. Monatsh. f. Chemie. Bd **29**. S. 157 (1908).

[5]) *Haiser* und *Wenzel* kamen schon mit 1 *g* zum Ziele.

destilliert. Der Rückstand wird mit Chloroform extrahiert, das Ungelöste nochmals in gleicher Weise acetyliert und wieder mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte werden vereinigt und 24 Stunden stehen gelassen, damit die Spuren von Hypoxanthin, welche in Lösung gegangen sind oder in der Flüssigkeit suspendiert blieben, Gelegenheit haben, sich vollständig auszuscheiden. Es wird sodann filtriert, bis zur Trockne abdestilliert und aus absolutem Alkohol unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert. Das Triacetylinosin scheidet sich jetzt sofort rein aus der alkoholischen Lösung beim Erkalten in prächtigen seidenglänzenden Nadeln aus.

1 *g* Triacetylinosin wird in 250 *ccm* $\frac{1}{10}$-n-Ätzbaryt eine halbe Stunde lang gekocht. Sodann wird mit der entsprechenden Menge $\frac{1}{10}$-n-Schwefelsäure der Baryt eben heraustitriert, so daß die Lösung weder Baryt noch Schwefelsäure enthält. Da die Flüssigkeit infolge ihres Gehaltes an Essigsäure saure Reaktion zeigt, muß der größte Teil derselben im Vakuum abdestilliert werden, der Rest wird über Schwefelsäure im Vakuum abgedunstet. Hierbei erstarrt das Ganze zu einer Kristallmasse, die nach dem Abpressen auf einer Tonplatte fast das Gewicht der theoretischen Ausbeute an Inosin hat. Das Rohprodukt wird zunächst aus Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert, wobei aus verdünnter Lösung feine, seidenglänzende Nadeln, aus konzentrierter sirupöser Lösung warzenförmige Drusen sich ausscheiden. Als bestes Mittel zum Umkristallisieren des Inosins hat sich bisher $80^0/_0$iger Weingeist erwiesen, aus dem das Inosin beim Erkalten in feinen seidenglänzenden Nadeln fast quantitativ ausfällt.

Crangitin, $C_{13}H_{20}N_2O_4$, bisher von *Ackermann* und *Kutscher*[1]) nur aus Krabbenextrakt dargestellt, bildet ein bei 162—165° schmelzendes, in Wasser schwer lösliches Goldsalz, $C_{13}H_{20}N_2O_4 . 2HCl . 2AuCl_3$. Das Chlorid schmilzt bei 160°.

Crangonin, $C_{13}H_{26}N_2O_3$, wie das vorige bisher nur aus Krabbenextrakt von *Ackermann* und *Kutscher*[2]) erhalten. Bildet ein Chloraurat, $C_{13}H_{26}N_2O_3 . 2HCl . 2AuCl_3$, das bei 130—140° schmilzt und frisch gefällt zuerst ein Öl, erst nachher Kristalle bildet.

Oblitin, $C_{18}H_{38}N_2O_5$, wurde von *Kutscher*[3]) aus *Liebigs* Fleischextrakt isoliert.

Das Platinat, $C_{18}H_{38}N_2O_5 . 2HCl . PtCl_4$, ist in kaltem Wasser schwer, in heißem leicht löslich. Unlöslich ist das Salz in absolutem Alkohol. Es zersetzt sich bei 230°.

Das Chloraurat, $C_{18}H_{38}N_2O_5 . 2HCl . 2AuCl_3$, ist in kaltem Wasser sehr schwer löslich, in heißem ziemlich leicht löslich.

[1]) *D. Ackermann* und *F. Kutscher*, Über Krabbenextrakt. IV. Mitteilung. Bd. **14**. S. 687 (1907).

[2]) Ebenda.

[3]) *Fr. Kutscher*, Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. **10**. S. 528 (1905).

Nachtrag zur quantitativen Glykogenanalyse.

Von **Eduard Pflüger**, Bonn.

Die erste und wichtigste Tatsache zur Beurteilung der in Betracht kommenden analytischen Methoden ist die Unangreifbarkeit des Glykogens durch Kalilauge. Dieses Reagens ermöglicht deshalb die Gewinnung des Glykogens aus den Organen des Tierleibes, weil sie diese in Lösung überführt, also das Glykogen aufschließt, so daß es dann mit Alkohol gefällt werden kann.

Mit der Unangreifbarkeit des Glykogens durch Kalilauge hat es aber eine besondere Bewandtnis. Denn wenn auch schon *Claude Bernard*[1]) und *August Kekulé*[2]) an diese Unangreifbarkeit glaubten, ergaben doch die Untersuchungen späterer Forscher, wie *v. Vintschgau* und *Dietl*[3]), *R. Külz*[4]) und mir selbst[5]), daß sogar verdünnte Kalilauge von 1 bis 2 % das Glykogen zu zersetzen scheint. Dr. *Josef Nerking*[6]) gelangte sogar zu dem Ergebnis, daß die Anwendung der Kalilauge bei der Glykogenanalyse aufzugeben sei. Denn nach seiner auf zahlreiche Analysen gegründeten Ansicht „wird durch den Einfluß der Kalilauge fortwährend neues Glykogen aufgeschlossen oder abgespalten, gleichzeitig aber auch schon gebildetes Glykogen durch die Kalilauge zerstört". Beiläufig sei hier daran erinnert, daß durch die Untersuchungen von *E. Pflüger*[7]) und *H. Löschke*[8]) die Angaben *Nerkings* widerlegt sind. Denn alles Glykogen läßt sich ohne Kali und nur durch siedendes Wasser den Organen entziehen, so daß keine Berechtigung zu der Annahme vorliegt, daß das Glykogen in den Organen chemisch gebunden sei und erst durch Kalilauge abgespalten werde.

Eine außerordentliche Schwierigkeit für das Verständnis der Kaliwirkung entstand aber, als ich sicher nachwies, daß Glykogen durch sehr

---

[1]) *Claude Bernard*, Leçons sur la Physiologie et la Pathologie du Système nerveux. T. **1**, p. 467 (1850).

[2]) *August Kekulé*, Pharmazeutisches Zentralblatt. S. 300 (1858).

[3]) *v. Vintschgau* und *Dietl*, Die quantitative Bestimmung des Glykogens. *Pflügers* Archiv. Bd. **13**. S. 253 (1876).

[4]) *R. Külz*, Über die Einwirkung warmer Kalilösungen auf Glykogen. Zeitschr. f. Biol. Bd. **22**. S. 161 (1886).

[5]) *E. Pflüger*, Die Bestimmung des Glykogens nach *Brücke* und *Külz*. *Pflügers* Archiv. Bd. **75**. S. 164 (1899).

[6]) *J. Nerking*, Beiträge zur Physiologie des Glykogens. *Pflügers* Archiv. Bd. **81**. S. 39 (1900).

[7]) und [8]) *H. Löschke*, Über die Berechtigung der Annahme, daß das Glykogen in den Organen chemisch gebunden ist. *Pflügers* Archiv. Bd. **102**. S. 592.

starke Kalilauge bei monatelang fortgesetztem Kochen in keiner Weise angegriffen werde. Und doch hatte ich[1]) selbst in Übereinstimmung mit *v. Vintschgau* und *Dietl* wie mit dem sehr exakten Arbeiter *R. Külz* ebenfalls Verluste beim Kochen von Glykogen mit verdünnter Kalilauge zugeben müssen.

Um eine Aufklärung der Paradoxie zu erlangen, dachte ich an die durch *F. W. Pavy*[2]) betonte Tatsache, daß das nach der Methode von *Brücke-Külz* dargestellte Glykogen durch die Salzsäure und das Kaliumquecksilberjodid und weitere Reinigung eine Veränderung erfährt, die es für Kalilauge angreifbar macht. Die dabei entstehenden Dextrine sollen sich durch diese Eigentümlichkeit auszeichnen. Ich stellte deshalb jetzt das Glykogen auf die schonendste Weise dar, indem ich es nur mit Wasser aus dem neutralisierten Organbrei oder auf andere Weise mit Ausschluß von Säuren und den *Brücke*schen Reagenzien auszog. Jetzt erwies sich dieses Glykogen als viel widerstandsfähiger, so daß der beim Kochen in verdünnter Kalilauge auftretende Verlust fast in die Beobachtungsfehler fiel, ja zuweilen ganz fehlte.

Ich mußte also in Betracht ziehen, ob nicht das von mir auf das sorgfältigste aus den Organen zu den Versuchen isolierte Glykogen doch eine Veränderung erfahren habe. Bereits in meinem großen Werke über das Glykogen sagte ich: „Ich kann also mit Sicherheit den vollkommenen Ausschluß von Fermentbildungen nicht behaupten." Ich wollte damit sagen, daß das von mir auf das sorgfältigste dargestellte Glykogen vielleicht doch eine Schädigung erfahren habe und nicht mehr identisch mit dem primär in den Organen enthaltenen Glykogen sei.

Da kam mir der richtige Gedanke, den frischen Organbrei in verdünnter Kalilauge beliebig lange zu kochen, aber zuletzt den Kaligehalt stark zu steigern und weiter zu kochen. Da sich nun herausstellte, daß derselbe Wert für das Glykogen erhalten wird, als wenn man gleich von Anfang an mit konzentrierter Kalilauge erhitzt hätte, so ist bewiesen, daß die verdünnte Kalilauge das in den Organen befindliche Glykogen in keiner Weise versehrt. Diese wichtige Tatsache ist in einer großen, unter meiner Leitung ausgeführten Untersuchung von Dr. *Georg Francke* festgestellt und in seiner Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der hohen veterinär-medizinischen Fakultät der Universität zu Bern genauer beschrieben. Demnach gilt der Satz: Glykogen kann mit Kalilauge beliebiger Konzentration beliebig lange gekocht werden, ohne daß es eine Spur von Zersetzung erfährt.

Da die wichtige Arbeit von *Georg Francke*[3]) sogar den Spezialisten unbekannt geblieben ist, wird es zweckmäßig sein, wenn ich die tatsächliche

[1]) *E. Pflüger*, Glykogen. S. 85. Bonn (1905).

[2]) *F. W. Pavy*, The Physiology of the Carbohydrates. An Epicriticism. p. 38. London 1895.

[3]) *Georg Francke*, Über die Ursache, weshalb die Glykogenanalyse bei Anwendung verdünnter Kalilauge zu niedrige Werte geliefert hat. — *Bernhard Schöndorff, Peter Junkersdorf* und *Georg Francke*, Über die Ursache der Fehlbeträge in der Glykogenanalyse bei Anwendung verdünnter Kalilauge. *Pflügers* Archiv. Bd. **127**. S. 274 (1909).

Begründung des Hauptergebnisses durch Wiederabdruck von wenigstens 2 Versuchsreihen hier mitteile.

Versuchsreihe mit Hundeleber. Doppelversuch.[1])

Nummer des Versuchs	Konzentration der Kalilauge	Kochdauer in Stunden	Prozentgehalt an Glykogen	Mittelwerte des Prozentgehaltes	Bemerkungen
C	30%	3	16·197	16·319	
D	30%	3	16·441		
7	1%	24 + 1	16·686	16·442	Nach 24stündigem Kochen auf 30% KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
8	1%	24 + 1	16·197		
9	1%	48 + 1	16·375	16·408	Nach 48stündigem Kochen auf 30% KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
10	1%	48 + 1	16·441		
11	1%	72 + 1	16·686	16·442	Nach 72stündigem Kochen auf 30% KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
12	1%	72 + 1	16·197		

Der Doppelversuch, der aus 6 Einzelversuchen besteht, ist so angestellt, daß die 1004·6 *g* wiegende Leber eines 12·7 *kg* schweren Hundes benutzt wurde, der auf Glykogen gemästet worden war. Von derselben Leber konnten also, nachdem sie wohlzerkleinert und gemischt war, für jeden der 6 Versuche je 50 *g* Brei verwandt werden.

Versuchsreihe mit Hundemuskel. Doppelversuche.[2])

Nummer des Versuchs	Konzentration der Kalilauge	Kochdauer in Stunden	Prozentgehalt an Glykogen	Mittelwerte des Prozentgehaltes	Bemerkungen
G	30%	3	2·034	2·041	
H	30%	3	2·048		
23	1%	24 + 1	2·034	2·0699	Nach 24stündigem Kochen auf 30% KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
24	1%	24 + 1	2·106		
25	1%	48 + 1	2·106	2·106	Nach 48stündigem Kochen wie Nr. 23 und 24 behandelt.
26	1%	72 + 1	2·1105	2·030	Nach 72stündigem Kochen auf 30% KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
27	1%	72 + 1	1·9499		

Es kann also kein Zweifel sein, daß diejenige Art des Glykogens, welches primär in den Organen enthalten ist, durch verdünnte Kalilauge nicht angegriffen wird.

[1]) *Pflügers* Archiv. Bd. **127**. S. 276. — *B. Schöndorff, P. Junkersdorf* und *Georg Francke,* l. c. 1909.

[2]) *Pflügers* Archiv. Bd. **127**. S. 277. — *B. Schöndorff, P. Junkersdorf* und *Georg Francke,* l. c. 1909.

Will man sich Rechenschaft ablegen über die Ursache, weshalb bei Anwendung verdünnter Kalilauge auf Glykogen größere Verluste bisher beobachtet worden sind als beim Erhitzen mit konzentrierter Kalilauge, so kommen wesentlich zwei Umstände in Betracht.

1. Wenn das Organ durch Kochen mit verdünnter Lauge in Lösung gebracht wurde, ist die Denaturierung des Eiweißes nicht weit genug vorgeschritten. Es sind also noch viele Eiweißflocken da, welche Glykogen einschließen, so daß es nicht ausgewaschen werden kann. Bei Kochen mit konzentrierter Lauge ist das Eiweiß denaturiert, so daß eine viel kleinere Menge von kleineren Flocken erhalten worden ist, die kein Glykogen mehr einschließen. — Ich habe ja quantitativ nachgewiesen, daß bei der Methode von *Külz* nach Anwendung der verdünnten Kalilauge oft ungeheuer große Glykogenmengen[1]) so in den Eiweißniederschlag eingebacken sind, daß sie nicht ausgewaschen werden können.

2. Die zweite Ursache zu Glykogenverlust hat ihren Grund darin, daß das Glykogen, wenn es aus dem Organe isoliert worden ist, durch die zur Isolation verwandte chemische Behandlung oder auch durch einwirkende Fermente eine Veränderung erfahren hat.

3. Nicht ausreichend aufgeklärt ist meine sonderbare Beobachtung, daß das angreifbar gewordene Glykogen bei Behandlung mit konzentrierter Kalilauge sich als resistent erweist. Ich beabsichtige diesen paradoxen Punkt nochmals eingehend zu prüfen.

Nachdem festgestellt war, daß tatsächlich die Ausbeute an Glykogen immer zu klein ausfällt, wenn verdünnte Kalilauge zur Aufschließung der Organe aufgewandt wird, war es notwendig festzustellen, wie groß die Konzentration der Kalilauge sein muß, um richtige Werte zu erhalten. Mit dieser Untersuchung habe ich Herrn *Paul Heyden* beauftragt, welcher dieselbe unter meiner Leitung in meinem Laboratorium bearbeitet und in seiner Inauguraldissertation[2]) veröffentlicht hat.

Bei der Vergleichung der Wirkung der 30%igen und 2%igen Lauge ergab sich ein sofort in die Augen springender großer Fehlbetrag bei Anwendung der verdünnten Lauge.

Auffallend erscheint es aber, daß bei Vergleichung der 30%igen Kalilauge mit der von 15% oder 7·5% zwar auch noch die reichere Ausbeute bei 30% sicher heraustritt, aber doch ist der Unterschied meist kleiner, ja fehlt ganz.

Da ein Unterschied aber auch bei Vergleichung von 30%iger mit 15%iger Kalilauge in gedachter Richtung noch deutlich bemerkbar bleibt, folgt, daß die richtige Stärke der Kalilauge 30% beträgt.

---

[1]) *E. Pflüger*, Glykogen. S. 39. Bonn 1905.

[2]) *Paul Heyden*, Über den Einfluß, den die Konzentration der Kalilauge auf die quantitative Analyse des Glykogens ausübt. Diss. Giessen. Dasselbe kürzer abgefaßt von *Bernhard Schöndorff, Peter Junkersdorf, Paul Heyden. Pflügers* Archiv. Bd. 126. S. 582 (1909).

Es blieb nun noch die Frage zu erörtern, wie lange die Organe mit 30%iger Kalilauge gekocht werden müssen, um die vollständige Zerstörung der Eiweißstoffe zu erzielen. Diese Aufgabe zu behandeln habe ich Herrn *Victor Hessen*[1]) übergeben, der seine Ergebnisse, die er unter meiner Leitung in meinem Laboratorium erhielt, in seiner Inauguraldissertation veröffentlicht hat.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß man dieselben Glykogenwerte erhält, wenn man die Organe ½, 1, 2 oder 3 Stunden mit 30%iger Kalilauge kocht: eine halbstündige Kochdauer genügt also, wenn man dafür Sorge trägt, daß der Kolben alle 5—10 Minuten aus dem Wasserbade herausgenommen und geschüttelt wird.

Die Begründung folgt aus diesen Tabellen:

Nummer der Versuchsreihe	Untersuchtes Organ	Mittelwerte des Glykogengehaltes in Prozenten nach Kochdauer in Stunden:			
		3	2	1	½
I	Muskel	0·3169	—	0·3223	—
II	„	0·885	—	0·8775	—
III	„	0·934	0·923	0·92	—
IV	„	1·185	1·212	1·232	1·185
V	Leber	13·568	13·282	13·428	13·401
VI	Muskel	2·4075	2·458	2·4198	2·4708
VII	Leber	17·7628	—	17·8339	17·6914
VIII	Muskel	3·897	—	3·85	3·897

	Kochdauer 3 Stunden	Kochdauer 1 Stunde
Mittel aus den Muskelwerten von Versuchsreihen I, II, III, IV, VI und VIII	1·6209%	1·6036%
Mittel aus den Leberwerten von Versuchsreihe V und VII	15·6654%	15·6808%

	Kochdauer 3 Stunden	Kochdauer 2 Stunden
Mittel aus den Muskelwerten von Versuchsreihe III, IV, VI	1·5088%	1·564%

	Kochdauer 3 Stunden	Kochdauer ½ Stunde
Mittel aus den Muskelwerten von Versuchsreihe IV, VI, VIII	2·4965%	2·5176%
Mittel aus den Leberwerten von Versuchsreihe V und VII	15·6636%	15·546%

Weil aber das häufige Herausnehmen des Kolbens aus dem siedenden Wasserbade äußerst lästig ist, verfahren wir gewöhnlich so, daß wir dies nur im Anfange ein- oder zweimal vollziehen, jedesmal gut schütteln und

[1]) *Victor Hessen*, Über den Einfluß, den die Zeit der Erhitzung mit starker Kalilauge auf die quantitative Analyse des Glykogens ausübt. Diss. Bern. 1909. — Dasselbe in abgekürzter Form von *Bernhard Schöndorff*, *Peter Junkersdorf*, *Victor Hessen*. *Pflügers* Archiv. Bd. **126**. S. 578 (1909).

dann 2 Stunden erhitzen. Das hat auch den großen Vorteil, daß die ausreichende Zerstörung der Gewebe selbst dann sicher erzielt wird, wenn es sich um die Aufschließung der Organe sehr alter Tiere handelt. Es ist z. B. sehr auffallend und von mir oft beobachtet, daß besonders bei Anwendung verdünnter Kalilauge die Lösung der Organe sich in außerordentlicher Weise verzögert, wenn es sich um sehr alte Tiere handelt.

Demgemäß verfahre ich nunmehr so: 100 *g* mit der Fleischhackmaschine zerkleinertes Organ werden eingetragen in einen Kolben, welcher bereits 100 cm^3 Kalilauge von 60% enthält und schon längere Zeit im siedenden Wasserbade bei 100° C erhitzt worden ist. Hierdurch wird die im Organbrei sich vollziehende Fermentation sofort unterbrochen. Nachdem der Kolben 10 Minuten im siedenden Bad war, wird er herausgehoben, geschüttelt und dann wieder in das siedende Bad zurückgebracht. Das wird dann 20 Minuten nach Beginn der Erhitzung wiederholt. — Sobald die Erhitzung 2 Stunden gedauert hat, wird der Kolben aus dem Wasserbad gehoben, unter der Pumpe durch einen kontinuierlichen Wasserstrahl abgekühlt und in ein Becherglas entleert. Mit 200 cm^3 Wasser wird der Kolben rein gespült, so daß die Lösung auf 400 cm^3 gebracht wird, die man dann mit 800 cm^3 Alkohol von 96% Tr. versetzt, gut umrührt und über Nacht mit einem Uhrglas verschlossen hinstellt, damit sich das Glykogen gut absetze. Ich mache darauf aufmerksam, daß es zuweilen vorkommt, daß das Glykogen trotz des notwendigen Alkoholzusatzes sich nicht flockig ausscheidet, sondern nur eine Trübung bildet, aus der sich das Glykogen erst nach Stunden in Gestalt eines feinen Staubes absetzt. Das kommt nicht bloß dann vor, wenn das Glykogen in Spuren vorhanden ist, sondern auch bei sehr reichlichem Gehalt. In solchen Fällen sieht es dann nach Zusatz des Alkohols zu der Glykogenlösung so aus, als ob kein Glykogen vorhanden sei, so daß der Unerfahrene, wie ich weiß, sich veranlaßt sieht, die ganze Flüssigkeit fortzugießen und damit einen groben Fehler zu begehen.

Es ist nicht unbedingt notwendig, nach der Fällung mit Alkohol bis zum anderen Tag zu warten mit der Filtration. Man kann schon damit beginnen, sobald sich die ersten Massen des Glykogens abgesetzt haben. Vorteilhafter ist es aber, die vollkommene Abscheidung des Glykogens abzuwarten.

Von dem großen Becherglas wird nun die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit in ein zweites geräumiges Becherglas abgegossen und sofort mit Hilfe eines sehr großen mit Hahn versehenen Trichters durch ein gutes Faltenfilter abfiltriert.

Der Glykogenniederschlag wird auf ein zweites schwedisches Filter gebracht, welcher einen Durchmesser von 15 *cm* besitzt. Dieser Niederschlag

wird mit 66%igem Alkohol so lange gewaschen, bis das Filtrat nahezu farblos abläuft. Dann folgt Waschung mit Alcohol absolutus, dann mit Äther und zuletzt nochmals mit absolutem Alkohol. Wie oft gewaschen wird, hängt von dem Gehalt von Farbstoffen ab.

Das Faltenfilter, welches die dekantierte Flüssigkeit aufgenommen hatte, wird nur mit 66%igem Alkohol gewaschen.

Es handelt sich jetzt darum, das Glykogen zu trennen von den Flocken und Farbstoffen, die es noch verunreinigen. Ich nehme das feuchte schwedische Filter vom Trichter, entfalte dasselbe über einem geräumigen Becherglas von ca. 300—500 *cm*³ Gehalt und streiche mit einem Platinspatel die ganze Schmiere vom Papiere ab, so daß sie in das Becherglas fällt. Dann bringe ich das Filter wieder auf den Trichter und befestige das Faltenfilter über das Filter, von dem das Glykogen abgewischt wurde. Es stehen also zwei Filter übereinander. Nunmehr gieße ich siedendes Wasser auf das Faltenfilter, so daß das Filtrat das untere Filter füllt und die noch anhaftenden Glykogenspuren löst, was man durch ein Pinselchen befördert. So erhält man das ganze Glykogen mit seinen Verunreinigungen in das Bechergläschen. Durch längeres Umrühren bringt man das Glykogen in Lösung und filtriert dann durch Glaswolle in ein geaichtes Kölbchen von 100—200—500—1000 *cm*³ Gehalt. Meist genügt ein Kölbchen von 200 *cm*³. Sind größere Glykogenmengen vorhanden, muß man geräumigere Kolben verwenden oder weniger Glykogenlösung zur Fällung mit Alkohol verwenden. Die trübe schmutzige Lösung wird nun in dem noch nicht ganz aufgefüllten Kölbchen abgekühlt und mit ein wenig Salzsäure von 1·19 spez. Gew. versetzt. Man tröpfelt vorsichtig zu, bis sich deutliche Flöckchen ausscheiden, welche durch klare Flüssigkeit geschieden sind. Gewöhnlich gebraucht man 0·5—1—2 *cm*³ bei Untersuchung von 100 *g* Organ. Gießt man zu viel oder zu wenig Salzsäure zu, so erhält man kein klares Filtrat. Man muß hier langsam mit großer Vorsicht die kleinen Zusätze machen. Einige Kubikzentimeter konzentrierte ClNa-Lösung befördern die Abscheidung der Flocken. Glaubt man die richtige Fällung erzielt zu haben, so füllt man das Kölbchen auf bis zur Marke, gießt in ein Becherglas aus und wartet einige Zeit, bis die meist stark gefärbten Flocken sich gesenkt haben. Dann filtriert man entweder durch ein schwedisches Filter oder durch „Blauband“ Nr. 589 aus der Fabrik von Schleicher & Schüll in Düren, wenn das schwedische Filter kein ganz klares Filtrat liefert.

Dieses Verfahren hat nun den großen Vorzug, daß das Filtrat sofort mit dem Polarisationsapparat auf seinen Gehalt an Glykogen untersucht werden kann. Ich werde dem Leser den Beweis liefern, daß diese Methode von unvergleichlicher Genauigkeit ist und außerordentlich schnell zum Ziele führt, obwohl es sich um eine quantitative Methode handelt.

Das Merkwürdige ist, daß bei richtiger Ansäuerung der unreinen Glykogenlösung ein vollkommen farbloses Filtrat erhalten wird, das sich zur Polarisation ausgezeichnet eignet. Es ist wahr, daß zuweilen eine Färbung vorhanden ist, die mich aber fast niemals verhinderte, die Ablesung machen zu können, nachdem ich entsprechend verdünnt hatte. Wenn ich das Glykogen aus besonderen Gründen mit 10 Vol. Alkohol gefällt hatte, machte sich der Farbstoff mit größerer Entschiedenheit wie sonst störend geltend.

Die durch die schwache Ansäuerung der rohen Glykogenlösung erzeugten flockigen Niederschläge sind von sehr verschiedener Beschaffenheit, aber immer nur von geringem Gewicht, wenn sie auch nach der Fällung durch ihr aufgequollenes Volum als große Masse imponieren. Beim Abfiltrieren dieser Fällungen sieht man, daß es sich nur um dünne Überzüge auf dem Filtrierpapier handelt. — Die Fällungen aus der Leberglykogenlösung sind immer stark gefärbt, und zwar sehr verschieden, so daß orangerote, gelbe und schwarze vorkommen, die sich auch durch ihre Löslichkeit in Alkohol von 66% und von Alcohol absolutus unterscheiden. Meist sind diese Farbstoffe in Äther unlöslich; doch ist dies nicht immer der Fall.

Stets ist ein großer Teil der Farbstoffe in verdünntem Alkohol von 66% und in absolutem Alkohol wie in Äther ganz unlöslich.

Die bei der Glykogenanalyse der Muskeln auftretenden Farbstoffe sind immer mit der Leber verglichen in sehr geringer Menge vorhanden.

Bei großem Reichtum an Glykogen ist die Menge der Verunreinigungen absolut und relativ viel geringer, und die Filtration vollzieht sich beim Auswaschen mit Alkohol sehr schnell und leicht.

Daß die Farbstoffflocken bei der Filtration keinen Fehler durch Zurückhaltung von Glykogen bedingen, habe ich schon früher streng bewiesen.[1])

Daß bei meiner Methode das Glykogen erhalten wird ohne andere polarisierende oder reduzierende Substanzen, wurde von mir dadurch bewiesen, daß in zahlreichen Analysen, die an Fröschen und Hunden unter den verschiedensten Lebensbedingungen erhaltenen Werte für den Glykogengehalt fast genau übereinstimmten, gleichgültig, ob derselbe durch Polarisation oder durch Titration des aus dem Glykogen durch Inversion erhaltenen Zuckers ermittelt worden war.

In 23 an Fröschen angestellten Vergleichsanalysen[1]) ergab sich als Glykogengehalt des ganzen Tieres:

durch Polarisation	durch Titration
0·6965%	0·6947%.

[1]) *Eduard Pflüger*, Unter gewissen Lebensbedingungen nimmt die in dem lebendigen Tierkörper enthaltene Menge des Glykogens trotz vollkommener, über Monate sich ausdehnender Entziehung der Nahrung fortwährend sehr erheblich zu. *Pflügers* Archiv. Bd. **120**. S. 285 (1907).

Ebenso in 48 an Hunden angestellten Vergleichsanalysen[1]) von Leberglykogen

durch Polarisation	durch Titration
2·227%	2·239%.

Ebenso in 7 Vergleichsversuchen betreffend den Glykogengehalt der Muskeln des Hundes

durch Polarisation	durch Titration
0·410%	0·411%.

Gleichwohl bleibt die Kontrolle der Polarisation durch die Titration wünschenswert.

Meine Tabellen beweisen, daß außer dem Glykogen kein drehender Körper vorhanden war und nach Invertierung des Glykogens neben dem Zucker keine Substanz, welche reduzierend wirkte.

Gleichwohl ist es vorgekommen, daß in einem Ausnahmefall die Polarisation einen um 14% höheren Wert als die Titration ergab. Eingehende Wiederholung des Versuches bestätigte die Tatsache, so daß die Annahme einer abnormen, das Glykogen begleitenden Substanz kaum bezweifelt werden konnte.

Bei diesen polarimetrischen Bestimmungen des Glykogens hat man es im allgemeinen mit Ablesungen von 2° zu tun; meistens handelt es sich um geringere Werte. Soviel ich gesehen habe, unterscheiden sich die Ablesungen der besten Beobachter um 0·01° bis 0·03°. Ist also die korrekte Ablesung 1·000°, so wird ein Fehler bis 3% begangen. Bei manchen Beobachtern ist aber der Fehler noch viel größer. Es läßt sich ja natürlich durch eine sehr große Zahl von Ablesungen ein der Wahrheit entsprechendes Mittel erzielen, wie es bei Bestimmung der spezifischen Drehung durchgeführt werden muß.

Weil man durch die Polarisation sehr annähernd den Gehalt an Zucker kennt, der durch Invertierung der Glykogenlösung entstehen muß, führt die Titration meist in wenigen Minuten zu einem sicheren Ergebnis, während die gravimetrische Methode immer einige Stunden erfordert. Ich habe deshalb die gravimetrische Methode mit *Volhards* Berichtigung nur angewandt, wo der Farbstoffgehalt der Glykogen- und Zuckerlösung die polarimetrische und *Fehling*sche Bestimmung unsicher oder unmöglich machte, oder wo die zu kleine zu bestimmende Zuckermenge die Titration nicht mehr ausführbar erscheinen ließ.

Demnach gestaltet sich die Analyse folgendermaßen: Ich fülle ein Rohr von 189·4 *mm* Länge mit der zu untersuchenden Glykogenlösung und mache am Halbschattenapparat drei Ablesungen

[1]) *Eduard Pflüger,* Meine Methode der quantitativen Analyse des Glykogens usw. *Pflügers* Archiv. Bd. 129. S. 374 (1909).

	$+ 2·10^0$		
	$+ 2·08^0$	Quarzplatte:	$+ 5·60^0$
	$+ 2·08^0$	Soll:	$+ 5·55^0$
Mittel:	$+ 2·087^0$		$+ 0·05^0$
Korrigiert:	$+ 2·066^0$.		

Weil nun die spezifische Drehung der Dextrose $= + 52·60^0$ [1]) und die des Glykogens $= + 196·57^0$ [2]), so hat man

$$\frac{196·57^0}{52·60^0} = 3·74 \text{ und } \frac{2·066^0}{3·74^0} = 0·552 \text{ Glykogen.}$$

Von einer Glykogenlösung werden nun 90 cm^3 in einem 150 cm^3-Kölbchen mit 5 cm^3 Salzsäure von 1·19 spez. Gew. 3 Stunden erhitzt, abgekühlt mit 60%$_0$iger Kalilauge neutralisiert, bis zur Marke aufgefüllt und durch schwedisches Filter filtriert, weil sich noch einige Farbstoffflöckchen ausgeschieden haben.

Invertiert wurden $^9/_{10}$ des in 100 cm^3 gelösten Glykogens, also

$$0·552 - 0·0552 = 0·4968\ g \text{ Glykogen.}$$

Nun hat *Nerking* durch eine genaue Untersuchung folgende Gleichung festgestellt:

$$\text{Glykogen} = \text{Zucker} \times 0·927.$$

Daraus folgt, daß 0·4968 Glykogen liefern müssen 0·5359 Dextrose, welche wir in 150 cm^3 gelöst hatten, so daß die Lösung 0·3573% Dextrose enthält.

Zur Analyse nach *Fehling-Soxhlet* wurden 10 cm^3 Kupferseignettesalzlösung + 40 cm^3 Wasser gebraucht, für deren vollkommene Reduktion 0·050 g Dextrose in runder Zahl nötig sind. Weil unsere Zuckerlösung gemäß des durch Polarisation bestimmten Wertes 0·3573 g Dextrose in 100 cm^3 enthält, würden rund 14 cm^3 dieser Zuckerlösung nötig sein, um die 10 cm^3 Fehling vollkommen zu reduzieren. Bei der ersten Analyse und Zusatz von 14 cm^3 Zuckerlösung gab das Filtrat der 2 Minuten gekochten Mischung noch eine Spur Reaktion mit Ferrocyankalium: bei Anwendung von 14·2 cm^3 reagierte das Filtrat nicht mehr auf dies Reagens. Also 14·1 cm^3 = 0·05 g Dextrose, also 100 cm^3 = 0·355 und 150 cm^3 = 0·533. Da dies nur $^9/_{10}$ der Gesamtmenge, so beträgt diese 0·592 g Dextrose, entsprechend 0·549 Glykogen.

Also:

Gemäß Polarisation: 0·552 g Glykogen,
" Titration: 0·549 " "

[1]) *H. Landolt*, Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen. II. Aufl. S. 446 (1898).

[2]) Mme *Gatin-Gružewska*, Das reine Glykogen. *Pflügers* Archiv. Bd. **102**. S. 577 (1904).

Der Unterschied beträgt absolut:

0·003 *g* Glykogen.

Bei dem vorliegenden Versuch entsprachen:

113 *g* Frosch = 0·552 *g* Glykogen oder
100 „ „ = 0·488 „ „

Betreffend die gravimetrische Methode verweise ich auf mein Werk: Glykogen (S. 53 und 111).

Ich möchte endlich noch auf den Vorzug meiner Methode aufmerksam machen, welcher es ermöglicht, die kleinsten Mengen von Glykogen quantitativ genau zu bestimmen, selbst da noch, wo die Titration, ja die gravimetrische Analyse versagen. Ich bestimme mit meinem Polarimeter noch Werte von 0·05 bis 0·01 *g* Glykogen auf 100 *g* Leber oder Muskel, und ich habe von diesem Vorteil vielfachen Gebrauch gemacht. — Sehr oft wird man bei der Seltenheit der Inkongruenz zwischen Polarisation und Titration auf Inversion und Titration zur großen Abkürzung verzichten dürfen!

Nachträge und Berichtigungen.

S. 16 ist die Quelle des Zitates zu berichtigen in Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **32**. S. 1961 (1899).

S. 182. Zeile 7: Lies $10\,SO_4Fe + 2\,MnO_4K$ etc.

S. 248 ff. Über den Nachweis und die Eigenschaften des Cholesterins sei noch auf die kürzlich erschienene Arbeit von *A. Windaus*, Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. **42**. S. 238 [1909]) ganz besonders hingewiesen.

S. 272. Fußnote [1]): Dean . . . (**1905**).

S. 273. Fußnote [2]): Vines, The Proteases of Plants . . .

S. 289. Zeile 20: Statt I. 2 a = **A. 2 a**.

S. 297. Zeile 13: **Kochsalzlösung** statt Natronlauge.

S. 306. Zitat [1]): Zeile 5: **1898** statt 1908.

S. 323. Zeile 8: Statt 100% lies **100 *g***.

S. 325. Zitat [3]): **S. 110** statt S. 276.

S. 333. Zeile 10: Statt 2·5% = **1·5**%.

S. 488. Isolierung des d-Glukosamins: Nach *H. Steudel* (Über den Nachweis von Amidozuckern. I. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 223 [1901] und Eine neue Methode zum Nachweis von Glukosamin und ihre Anwendung auf die Spaltungsprodukte der Mucine. Ebenda. Bd. **34**. S. 352 [1901]) eignet sich zum Nachweis des Glukosamins die Phenylisocyanatverbindung besonders gut. Bei Behandlung einer alkalischen Lösung von Glukosamin mit Phenylisocyanat fällt das Glukosaminadditionsprodukt aus, während eventuell vorhandene Verbindungen mit Aminosäuren in Lösung bleiben und erst beim Ansäuern ausfallen würden.

S. 819. Zitat [1]): Lies **Andersson** statt Anderson.

S. 914. Zeile 4 des Textes: **Guvacin** statt Guracin.

S. 914. Zitat [1]): **Tschirch** statt Tschirsch.

S. 929. Zeile 21: **Tropanderivate** statt Propanderivate.

S. 955. Zeile 17: **Robertson** statt Roberts.

S. 997: Lies statt Procter stets **Proctor.**



Register.

Die beigedruckten Ziffern bedeuten die Seitenzahlen.

A.

B.

C.

D.

E.

F.

G.

I.

J.

K.

L.

M.

N.

O.

P.

Q.

R.

S.

T.

U.

V.

Druck von Gottlieb Gistel & Cie. in Wien.



